

Physiologische Untersuchungen zur Rassenfrage von Azotobakter

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

Vorgelegt von

Maria Schlüter
aus Freising

Oktober 1958

1 9 5 9

Buchdruckerei F. Mitzlaff KG., Rudolstadt i. Thür.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. FRANZ BUKATSCHE

2. Berichterstatter: Prof. Dr. LEO BRAUNER

Tag der mündlichen Prüfung: 26. November 1958

Abdruck aus dem

Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten
und Hygiene. II. Abteilung

Herausgegeben von Prof. Dr. RICHARD KOCH, Berlin,
und Oberregierungsrat Dr. C. STAPP, Braunschweig.

VEB GUSTAV FISCHER VERLAG JENA

Satz und Druck: Buchdruckerei F. Mitzlaff KG., Rudolstadt (V/14/7)

Printed in Germany

Veröffentlicht unter der Lizenznummer ZLN 5087

Physiologische Untersuchungen zur Rassenfrage von *Azotobakter*.*)

Maria Schlüter und Franz Bukatsch.

Mit 8 Abbildungen im Text und Tafel II.

Einleitung.

Die Fähigkeit von *Azotobakter*, freien Stickstoff aus der Luft zu binden sowie Wirkstoffe für höhere Pflanzen abzuscheiden (BUKATSCH und HEITZER, 1952, BURGER, 1958), bedingt u. a. seine wichtige Stellung innerhalb der Gruppe der Bodenbakterien. In der folgenden Arbeit soll nun die Stammesfrage, die sich unmittelbar aus dem mannigfachen Vorkommen ergibt, einer näheren Betrachtung unterzogen werden.

Serologische Methoden, die bei Knöllchenbakterien schon sehr weit geführt haben, wurden von EBERT und RUBEL (1934) für *Azotobakter* angewandt. Sie zeigten, daß einzelne Stämme von *Azotobacter chroococcum* und *Azot. agile* sich stark voneinander unterscheiden. Verschiedene Rassen von *Azot. chroococcum* lassen sich in bezug auf ihre antigenen Eigenschaften nicht in einer gemeinsamen Gruppe zusammenfassen, während die Rassen von *Azot. agile* als eine Gruppe angesehen werden können.

STAPP und RUSCHMANN (1924) fanden Unterschiede gradueller Art bei den einzelnen *Azot. chroococcum*-Stämmen, und zwar hinsichtlich der verschiedenen Kolonienform, der starken Schleim- und Pigmentproduktion, der Reservestoffablagerung und einem unterschiedlichen Wahlvermögen gegenüber Kohlenstoffquellen.

OMELIANSKY und SIEBER (1913), GREENE (1935), KANDLER und ZEHENDER (1955) untersuchten die Eiweißzusammensetzung von *Azot. chroococcum*. Die letztgenannten Autoren fanden 17 Aminosäuren und Glukosamin.

VIRTANEN u. Mitarb. (1937) wiesen in zellfreien Filtraten junger *Azotobakter*kulturen Ausscheidung von Asparaginsäure nach.

Im *Azotobacter chroococcum*-Schleim vermutete STAPP (1924) einen kohlenhydratartigen Stoff, was durch Arbeiten von COOPER und Mitarb. (1938), DUGUID (1948), sowie LAWSON u. STACEY (1954) bestätigt wurde. COOPER (1938) und DUGUID (1948) fanden darin 90% Glukose und 3—4% Uronsäuren.

Eine Fluoreszenz der Nährlösungen einzelner *Azotobakter*stämme im UV-Licht wurde bereits von JOHNSTONE (1955) beschrieben. Jedoch erfolgte bis jetzt noch keine Auftrennung der fluoreszierenden Stoffe in den *Azotobakter*filtraten.



Material und Methodik:

In unseren Versuchen wurden folgende Stämme verwendet:

Azotobacter chroococcum:

St. ATCC 4412 (Americ. Type-Culture-Collection),

St. *Epilobium*

St. *Mirabilis*

St. *Viola*

} Bot. Institut München, Dr. K. BURGER.

Azotobacter beijerinckii (farblos):

St. *Taraxacum*

St. *Triticum*

} Bot. Institut München, Dr. K. BURGER.

Azotobacter agilis (mit Sekretion eines gelb fluoreszierenden Farbstoffes)
von der Biol. Reichsanstalt, Berlin-Dahlem, Dr. BORTELS (über Greifswald).

Azotobacter vinelandii

St. BLK 1

Delft, Dr. BECKING.

Azotobacter indicum:

St. *Beijerinckia* III 1216

St. *Beijerinckia* III 1217

} Java, Dr. BECKING.

Die genannten Stämme wiesen große morphologische Unterschiede auf, wie aus den Abb. 1—10 (Tafel II) hervorgeht.

Die einzelnen *Azotobacter*-Stämme wurden in Schrägagarröhrchen gehalten, immer wieder überimpft und wiederholt mikroskopisch auf ihre Reinheit geprüft.

Für die G r u n d n ä h r l ö s u n g erwies sich nach mehreren Versuchen folgende Zusammensetzung als sehr günstig:

1 l aq. font., 1 g CaCO_3 , 0,5 g K_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,05 g FeSO_4 , 0,005 g Na_2MoO_4 .

Der feste N ä h r b o d e n enthielt außerdem 2% Mannit und 2% Agar.

Zur A n z u c h t der Bakterien in flüssigem Medium wurden zur Prüfung der Verwertbarkeit verschiedener C-Quellen statt 2% Mannit (Kontrolle) noch folgende Stoffe zugesetzt:

Je 1% Na-azetat, -propionat, -succinat bzw. 0,5% Na-benzoat.

Als Kulturgefäße dienten 1,8-l-Fernbachkolben; die Schichtdicke von 300 ml Nährlösung war dabei so niedrig, daß kein Sauerstoffmangel auftrat. Außerdem wurden die Kolben für die Dauer der Anzucht auf einer Schüttelmaschine gleichmäßig bewegt.

Die Abtrennung der Bakterienmasse vom Substrat erfolgte mittels einer hochtourigen Zentrifuge (Umdrehungszahl von 12 000—15 000/Min.). Nach etwa 15 Min. hatte sich die Bakterienmasse sehr gut abgesetzt. Sie wurde in der Zentrifuge mit aq. bid. gewaschen, das Washwasser mit der Kulturlösung vereinigt.

Die Weiterverarbeitung von Bakterien und Kulturlösung erfolgte nun je nach Untersuchungszweck auf verschiedene Weise.

Die B a k t e r i e n m a s s e wurde 24 Std. im Thermostaten bei 100° C getrocknet. Zur vollständigen Entfernung noch etwaiger anhaftender fester Bestandteile der Nährlösung (CaCO_3) behandelten wir sie dann äußerst vorsichtig mit verdünnter HCl und aq. bid. nach und zwar so lange, bis das Washwasser keine saure Reaktion mit pH-Papier mehr gab. Nach einer weiteren 48 stündigen Trocknung bei 100° C wurde dann das Trockengewicht ermittelt.

Die Hydrolyse der Eiweißsubstanz des Bakterienkörpers führten wir nach der Vorschrift von CRAMER (1958) durch. Den Trockenrückstand nahmen wir vorsichtig mit 2 ml aq. dest. auf, neutralisierten ihn mit einigen Tropfen n-Natronlauge und füllten schließlich auf 2,5 ml Flüssigkeit auf.

Die Auftrennung der so gewonnenen Lösung erfolgte mit Hilfe der Papierchromatographie. Hierzu wurden mit einer präzise geeichten Elphor-Pipette $5 \times 0,010$ ml des Hydrolysates auf einen vorher markierten Startfleck gebracht.

Die Chromatographie erfolgte auf ca. 30 : 30 cm messenden quadratischen Bögen (SCHLEICHER-SCHÜLL-Papier Nr. 2043 b), nach der aufsteigenden Methode, zweidimensional, dunkel, bei konstanter Temperatur.

Als Lösungsmittel für Aminosäuren fanden folgende Gemische Verwendung:

Erste Richtung:

1. Butanol-Eisessig-Wasser (40—10—50)
2. Butanol-Ameisensäure-Wasser (75—15—10)
3. α -Picolin (70 α -Picolin, 28 H₂O, 2 konz. NH₃)
4. Isopropanol-Eisessig-Wasser¹⁾ (70—10—20)

Zweite Richtung:

- Phenol (80 proz. Lösung)
- Phenol (80 proz. Lösung)
- Phenol (80 proz. Lösung)
- Methanol (80), H₂O (17,5),
10 n HCl (2,5), Pyridin (10)

Die besten Trennungen ergaben α -Picolin/Phenol. Zur Verhinderung der raschen Autoxydation von Phenol wurde unter die Glasglocke ein Zusatzgefäß mit einigen Körnchen KCN gestellt.

Als Entwickler für Aminosäuren dienen:

1. Ninhydrin p. a. (750 mg Ninhydrin/250 ml 95 proz. Äthanol/10 Tropfen verdünnte HCl).
2. Reagens nach FOLIN: 0,2 g Natrium- β -naphthochinonsulfonat (Merck) und 5 g Natriumcarbonat (wasserfrei p. a.) in 100 ml aq. dest.

Zusätzlich wurden noch verschiedene Nachweise für einzelne Aminosäuren mit folgenden Reagentien geführt:

1. Reagens nach EHRLICH: 2 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 ml 20 proz. Salzsäure für Tryptophan.
2. Reagens nach SAGAGUCHI: Alkoholische Lösung von 0,1% α -Nitroso- β -Naphthol für Tyrosin.
3. 0,1% Ninhydrin in Azeton für α , ϵ -Diaminopimelinsäure (nach L. E. RUHLAND und E. WORK 1955).

Die zentrifugierte Kulturlösung wurde bei großer Oberfläche im Trockenschrank auf ein Volumen von ca. 10—20 ml eingengt und in kleinen Petrischalen bei gleicher Temperatur bis zur Trockene eingedampft.

Zum Nachweis freier Aminosäuren und freier Zucker wurde diese von den die Chromatographie störenden Salzen durch Extraktion mit 10 ml 70 proz. Alkohol 72 Std. im Kühlschrank getrennt. Im Warmluftstrom wurde bis zu einem endgültigen Volumen von 3 ml eingengt und durch eine entsprechende Zugabe von Äthanol die Alkoholkonzentration etwa wieder auf 70% gebracht.

Die chromatographische Auftrennung der in der alkoholischen Lösung enthaltenen freien Aminosäuren erfolgte ein- und zweidimensional in oben angegebener Weise.

Zunächst soll die Hydrolyse der Polysaccharide beschrieben werden, die in die Nährlösung abgegeben wurden. Die im Trockenschrank vorsichtig bei einer max. Temperatur von 50° C stark eingengte Kulturlösung wurde möglichst genau auf pH = 7,0 mit verdünnter Schwefelsäure bzw. Salzsäure eingestellt. (Prüfung mit Lyphan- und Merck-Spezial-pH-Papier.) Nach Zugabe von absol. Alkohol bildete sich bei einzelnen Stämmen ein Niederschlag, der bei den gleichen Stämmen auch auftrat, wenn die stark konzentrierte alkalische Nährlösung angesäuert wurde. Nun gaben wir soviel Alkohol bzw. Säure dazu, bis das Filtrat niederschlagsfrei war.

Die Hydrolyse der Kulturlösung bzw. des Niederschlags erfolgte mit 2 n Schwefelsäure im zugeschmolzenen Glasrohr bei 100° C für die Dauer von 3 Std.

Nach dem Erkalten neutralisierten wir das Hydrolysat mit Ba(OH)₂. Der erhaltene Niederschlag wurde mehrmals mit warmem Wasser nachgewaschen, um ein Zurückbleiben von Zucker zu vermeiden.

Das Filtrat überführten wir in 50 ml Kjeldahlkolben und dampften bei max. 80° C bis zur Trockene ein.

Zu dem so erhaltenen festen Rückstand wurden 5—10 ml 70 proz. Äthanol gegeben und die Kolben für die Dauer von 72 Std. in den Eisschrank gestellt. Die derart herausgelösten Zucker wurden in kleinen Schälchen mit Warmluft getrocknet und in 0,5—1 ml 70 proz. Äthanol aufgenommen.

Die Chromatographie dieser Zucker erfolgte aufsteigend, ein- und zweidimensional mit folgenden Gemischen als Lösungsmittel:

1. Richtung:

1. Butanol-Eisessig-Wasser (40—10—50)
2. Isopropanol-Wasser-Eisessig (70—20—10)

2. Richtung:

- Phenol (80 proz. Lösung)
- Phenol (80 proz. Lösung)

¹⁾ Lösungsmittel speziell zum Nachweis von α , ϵ -Diaminopimelinsäure.

Zur Sichtbarmachung der Zucker fanden folgende Entwickler Verwendung:

1. Anilinthalat (1,66 g Phthalsäure und 0,93 g Anilin in 100 ml wassergesättigtem Butanol gelöst).
2. Benzidin (0,5 g Benzidin, 20 ml Eisessig, 80 ml abs. Alkohol).

Die mit Anilinthalat entwickelten Chromatogramme wurden außerdem noch im UV-Licht geprüft.

Die fluoreszierenden Stoffe im alkoholischen Extrakt der Nährlösung wurden auf SCHLEICHER-SCHÜLL-Papier Nr. 2043 b mit n-Propanol-Wasser (70—30), das die besten Trennungen ergab, chromatographiert.

Sämtliche Extrakte und Hydrolysate wurden im Eisschrank bei niedriger Temperatur bis zur Verarbeitung aufbewahrt.

Versuche und Ergebnisse:

A. Untersuchungen des Bakterienkörpers.

1. Einfluß verschiedener Kohlenstoffquellen auf das Wachstum der einzelnen Azotobakterstämme

STAPP und RUSCHMANN (1925) untersuchten den Einfluß verschiedener Kohlenstoffverbindungen auf das Wachstum von Azotobakter und fanden, daß von 22 Salzen organischer Säuren *Azot. chroococcum* 17, *Azot. agile* dagegen nur acht als Energiequellen verwerten können. K. FISCHER (1950) stellte bei ernährungsphysiologischen Untersuchungen bei Azotobakter Unterschiede in der Verwertung von Kohlenstoffquellen fest; GAINNEY (1928) fand ein je nach der Energiequelle verschiedenes Stickstoff-Bindungsverhältnis, bezogen auf die verbrauchte Kohlenstoffmenge.

In Vorversuchen wurde zunächst geprüft, ob das erwähnte Wahlvermögen gegenüber Kohlenstoffquellen bei unseren Stämmen überhaupt vorlag. Daraus ergab sich dann die Auswahl geeigneter C-Quellen für unsere weiteren Untersuchungen.

Außer dem sechswertigen Alkohol Mannit, als Vergleichsgrundlage, wurden Natrium- und Kaliumsalze aliphatischer und aromatischer Carbonsäuren verwendet, die sich entweder in ihrer Kettenlänge oder im räumlichen Aufbau ihrer Moleküle unterschieden: Natriumazetat, Natriumpropionat, Natrium-n-butytrat, Natriumsuccinat, Kaliumzitrat und Natriumbenzoat.

Die Nährlösungen, mit dem jeweiligen organischen Salz als Kohlenstoffquelle, wurden mit KOH-Lösung auf pH = 7 eingestellt und je 30 ml der einzelnen Kulturlösungen in 100-ml-Erlenmeyer-Enghalskölbchen gegeben, diese 30 Min. im Dampftopf unter Druck sterilisiert. Nach Abkühlung erfolgte die Beimpfung der Nährmedien. Je eine unbeimpfte Blindprobe diente als Kontrolle. Anschließend standen die Kulturen 9 Tage auf der Schüttelmaschine bei einer Raumtemperatur von ungefähr 28° C.

Es zeigte sich, daß auch die von uns verwendeten Stämme auf den dargebotenen Kohlenstoffquellen ein unterschiedliches Wachstum aufwiesen. Auf Kaliumzitrat war die Entwicklung sämtlicher Stämme gering; für weitere Untersuchungen kam es deshalb nicht mehr in Frage. Natriumbutytrat bewirkte im allgemeinen ein sehr zufriedenstellendes Wachstum. Als Kohlenstoffquelle konnte es aber nicht weiter verwendet werden, da es im Handel — trotz wiederholter Bemühungen — nicht rein zu erhalten war.

Die beiden *Azot. indicum*-Stämme gediehen sehr langsam. Erst nach ca. 10—14 Tagen zeigte sich in den Kulturen eine Schleimbildung. Dieser Schleim erwies sich später beim Zentrifugieren als sehr zäh und fadenziehend und trennte sich schlecht von den Lösungen ab. Wie aus Tab. I ersichtlich, war das Wachstum der Stämme *Beijerinckia* 1216 und 1217 auf Mannit

Die Wachstumsergebnisse sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1.

Stamm <i>Azot. chrooc.</i>	Kohlenstoffquelle						
	Mannit	Azetat	Butyrat	Citrat	Propion.	Succin.	Benzoat
ATCC 4412 .	++++	++++	++	+ (—)	+++	+++	—
Epilobium . .	++++	++++	++(+)	+	+++	+++	—
Mirabilis . . .	++++	++	++	— (+)	+++	+ (+)	+++
Viola	++++	++(+)	+++	+	+++	++	+++
<i>Azot. beij.</i>							
Taraxacum .	++	+	+	+ (—)	+	+	+
Triticum . .	+++	+++ (+)	+ (+)	+	+ (+)	+ (+)	+ (+)
<i>Azot. agile</i>	++++	++	++(+)	+	+++	++	+++
<i>Azot. vin.</i>							
BLK 1 . . .	++++	++(+)	+++	+	+++	+++	+++
<i>Azot. indic.</i> ¹⁾							
Beijerinckia							
1216. . . .	++++	— (+)	+	— (+)	+	— (+)	+ (—)
Beijerinckia							
1217. . . .	++++	— (+)	+	— (+)	+	+ (—)	+ (—)
Kontrolle unbeimpft .	—	—	—	—	—	—	—

¹⁾ Dem sehr langsamen Wachstum von *Azot. indicum* entsprechend, wurden diese beiden Stämme erst nach 21 Tagen getestet.

Zeichenerklärung: — keine Entwicklung, + sehr geringe Entwicklung, ++ mäßige Entwicklung, +++ gute Entwicklung, ++++ besonders gute Entwicklung, () bedeutet Zwischenstellung.

Die graduellen Unterschiede des Wachstums wurden visuell ermittelt.

sehr gut, auf den anderen dargebotenen Kohlenstoffquellen dagegen äußerst mäßig.

Die *Azot. beijerincki*-Stämme verwerteten die Salze der Carbonsäuren ebenfalls schlecht. Lediglich Stamm *Triticum* zeigte auf Natriumazetat ein relativ gutes Wachstum.

Azot. agile und *Azot. vinelandii* (Stamm BLK 1) wuchsen mit Ausnahme von Kaliumzitat auf jeder dargebotenen C-Quelle gut.

Dasselbe Ergebnis war im allgemeinen bei den *Azot. chroococcum*-Stämmen zu beobachten. Besonders bemerkenswert ist hier jedoch, daß sowohl Stamm ATCC 4412 als auch der *Epilobium*-Stamm auf Natriumbenzoat nicht wachsen konnten, eine Tatsache, die deutlich auf Unterschiede innerhalb der *Azot. chroococcum*-Gruppe hinweist.

2. Farbstoffbildung der Bakterien auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Die Farbstoffbildung der *Azotobakter*stämme ist sehr variabel und steht mit den Kulturbedingungen in engem Zusammenhang. Von Wichtigkeit für die Pigmentbildung sind neben der Sauerstoffzufuhr (OMELIANSKY 1911)¹⁾ vor allem die Kohlenstoffquellen.

¹⁾ Referiert von E. UNGERER (1934).

Kohlenstoffmangel fördert nach JONES (1913)¹⁾ und RIPPEL (1925)¹⁾ die Pigmentbildung, Kohlenstoffüberschuß hemmt sie (STAPP und RUSCHMANN 1924). Wie BEIJERINCK (1902)¹⁾ schon festgestellt hat, ist die Art der Kohlenstoffquelle ebenfalls hierfür von Bedeutung, was auch in den folgenden eigenen Versuchen erweitert und bestätigt werden konnte.

Je nach der chemischen Zusammensetzung der dargereichten Kohlenstoffquelle war der Farbtypus und die Farbintensität der von uns verwendeten Azotobakterstämme sehr verschieden. Die Kulturen wurden in Fernbach-Kolben herangezogen. Das Wachstum war im Durchschnitt mittelmäßig bis gut. (Für die *Azot. indicum*-Stämme und die *Azot. beijerinckii*-Stämme gilt dies nur für Mannit bzw. Azetat.) Das Ergebnis nach 14 Tagen bringt Tab. 2.

Tabelle 2.

Stamm	Bakterienfarbe				
	Mannit	Azetat	Propionat	Succinat	Benzoat
ATCC 4412 .	hellbraun	dunkelbraun	rötl. braun	dunkelbraun	—
Epilobium .	dunkelbraun	dunkelbraun	dunkelbraun	dunkelbraun	—
Mirabilis . .	mittelbraun	hellbraun	hellbraun	s. hellbraun	dunkelbraun
Viola	dunkelbraun	mittelbraun	mittelbraun	mittelbraun	braun
<i>Azot. agile</i>	hellbraun	dunkelbraun	dunkelbraun	dunkelbraun	mittelbraun
BLK 1 . . .	karamel	dunkelbraun	dunkelbraun	braun	dunkelbraun
Beijerinckia 1216 . . .	farblos		sehr schlechtes Wachstum		
Beijerinckia 1217 . . .	farblos		sehr schlechtes Wachstum		
Taraxacum .	farblos		sehr schlechtes Wachstum		
Triticum . .	farblos	farblos	Wachstum schlecht		

Die Farbstoffbildung erfolgte relativ spät. Dasselbe war bei Kulturen, die auf festem Nährboden mit 2% Agarzusatz gezogen wurden, zu beobachten. Eine Braunfärbung der raschwüchsigen *Azot. chroococcum*-Stämme Epilobium und Viola auf Agarnährboden unter Zugabe von 2% Mannit setzte erst nach ca. 5 Tagen ein. Die Verfärbung der weißen Kolonien begann an der Spitze der Schrägagarschicht, an einer Stelle also, wo der Nährstoffgehalt bald erschöpft war.

Das Pigment ist ein Melaninkörper, vermutlich durch enzymatische Oxydation von Tyrosin gebildet. Die Melanine, von denen es verschiedenartige gibt²⁾, gehören zu den verbreitetsten Pigmenten. Weder ihre chemische Struktur, noch ihre Entstehungsweise sind in allen Einzelheiten bekannt. Es scheint aber, daß ihnen das C-Gerüst des Indols zugrundeliegt.

In den bisherigen Untersuchungen zeigten unsere Azotobakterstämme ein ausgesprochenes Wahlvermögen der dargebotenen Kohlenstoffquellen und unterschiedliche Farbstoffbildung.

¹⁾ Ref. v. E. Ungerer (1934).

²⁾ Zitiert nach LEUTHARDT, Lehrbuch der Physiologischen Chemie. Berlin 1957, Walter de Gruyter Verlag.

Nun soll die Verwertung der verschiedenen Kohlenstoffgerüste zum Aufbau von arteigenem Eiweiß bei den einzelnen Azotobakterstämmen untersucht werden. Daraus ergeben sich folgende Fragen:

1. Welche Zusammensetzung hat das Azotobaktereiweiß?
2. Beeinflussen die verschiedenen Kohlenstoffquellen die Aminosäurezusammensetzung des Eiweißes qualitativ und quantitativ?

3. Verwertung der verschiedenen Kohlenstoffgerüste zum Aufbau von arteigenem Eiweiß

a) Wachstumsintensität der Bakterienstämme.

Verwendet wurden alle *Azot. chroococcum*-Stämme, *Azot. vinelandii*, *Azot. agile* und je ein *Azot. indicum*-Stamm (Beijerinckia III 1217), ein *Azot. beijerinckii*-Stamm (Triticum).

Die Anzucht erfolgte in 1,8-l-Fernbachkolben. Zu 300 ml Nährlösung in der üblichen Zusammensetzung wurde die jeweilige Kohlenstoffquelle in bestimmter Menge beigegeben und anschließend nach erfolgter Neutralisation 30 Min. unter Druck sterilisiert. Auf eine mengenmäßig ungefähr gleiche Beimpfung wurde geachtet. Die Kulturdauer betrug 14 Tage und zwar aus folgender Überlegung:

1. Der Eiweißgehalt der Bakterientrockenmasse von Azotobakter ist nach Angaben von F. RADLER (1955) zwischen 10 und 15 Tagen am größten.
2. Außerdem war nach dieser Zeit auch für langsam wachsende Stämme die Gewähr eines guten, gleichmäßigen Wachstums gegeben.

Bei Mannit als C-Quelle zeigten raschwüchsige Stämme meist schon nach einem Tag sichtbares Wachstum; bei weniger gut verwertbaren C-Quellen (wie z. B. Na Succinat für die Stämme *Mirabilis* und *Viola* oder Azetat für Stamm BLK 1) erst nach 2—3 Tagen. Die lange Inkubationszeit ist sicher durch die Einstellung des Bakterienstoffwechsels auf die dargebotene Nahrungssubstanz bedingt. (Bildung adaptiver Enzyme.)

Das Ergebnis der Trockengewichtsbestimmung ist in Abb. 1 zusammengestellt.

Auf Mannit wuchsen alle Stämme außerordentlich gut. Das relativ schlechtere Wachstum der Stämme auf den übrigen C-Quellen mag u. a. darin begründet sein, daß mit dem Abbau der organischen Natriumsalze eine zunehmende Alkalisierung der Nährlösung verbunden ist, während bei Mannit der pH-Wert ziemlich konstant beim Neutralpunkt bleibt.

Für die Wachstumsunterschiede ist die mengenmäßig verschiedene Zugabe von Mannit mit 2%, Benzoat mit 0,5% und den übrigen Kohlenstoffquellen mit 1% ohne Bedeutung, da Versuche mit verschiedenen Konzentrationen zeigten, daß die gewählte Prozentzahl jeweils Maximalbedingungen darstellt.

Stamm ATCC 4412 bildete auf Mannit als Kohlenstoffquelle große Mengen eines gallertartigen Schleimes, so daß eine Trockengewichtsbestimmung nicht genau durchgeführt werden konnte; bemerkenswert ist hierbei, daß eine Schleimbildung in diesem Ausmaß auf den übrigen von ATCC 4412 verwerteten C-Quellen nicht erfolgte.

In Tab. 3 fällt auf, daß sich *Azot. agile* und *Azot. vinelandii*, die beide durch die Abscheidung eines später noch näher besprochenen gelbgrün fluoreszierenden Stoffes in die Nährlösung charakterisiert sind, auch in ihrem Wahlvermögen gegenüber den gebotenen C-Quellen sehr ähnlich verhalten.

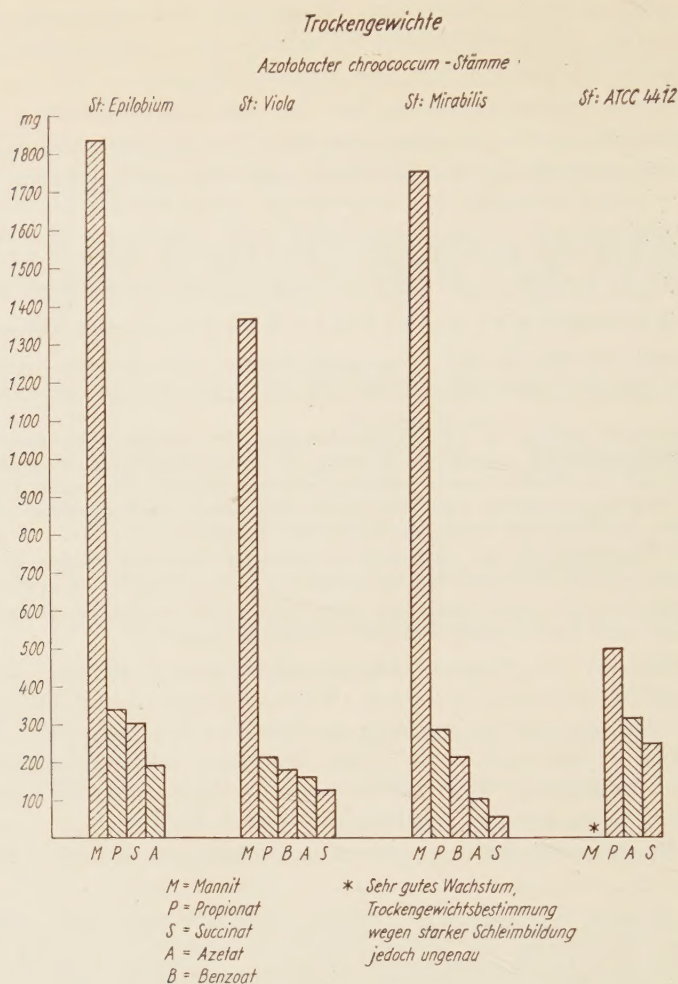


Abb. 1a.

Tab. 3. Wuchsvergleich in % (bezogen auf Mannit = 100).

Stamm	Kohlenstoffquelle				
	Mannit	Azetat	Benzoat	Propionat	Succinat
Epilobium .	100	10,5	—	18,5	16,5
Mirabilis . .	100	5,8	12,3	16,2	3,1
Viola	100	11,8	13,2	15,7	9,1
<i>Azot. agile</i> .	100	7,5	29,1	25,0	13,5
BLK 1 . . .	100	9,8	27,2	26,4	11,4
Triticum . .	100	121,4	—	—	—

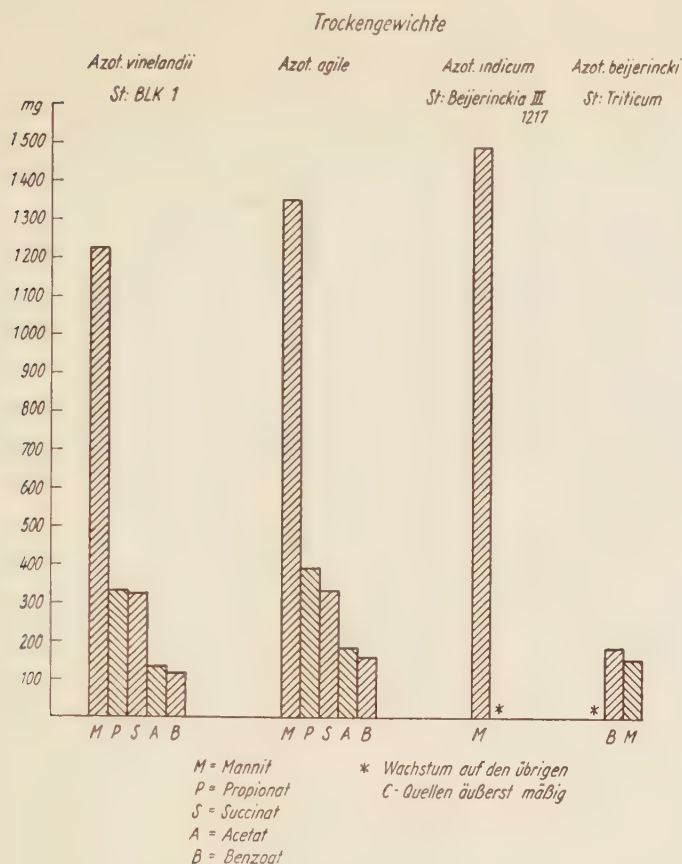


Abb. 1b.

b) Morphologie der Azotobakterzellen auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Vor weiteren Untersuchungen über die Zusammensetzung des Azotobaktereiweißes prüften wir, inwieweit die verschiedenen Kohlenstoffquellen die Wuchsform der Azotobakterzellen beeinflussen. STAPP und RUSCHMANN (1924) beschreiben nämlich bei einer makroskopisch guten Entwicklung in einigen Fällen einen nachteiligen Einfluß organischer Salze auf die Gestalt von Azotobakterzellen. Sie berichten vom Auftreten besonders vieler kleiner Formen, die entweder nur geringe Reservestoffeinlagerungen hatten oder in denen der einzig vorhandene Reservestoff in Kugelform fast die ganze Zelle ausfüllte.

In einer besonderen Versuchsreihe prüften wir unsere eigenen Stämme sorgfältig auf dieses Verhalten und konnten mikroskopisch keine Unterschiede in der Wuchsform auf den dargereichten Kohlenstoffquellen feststellen.

Eine bei „Involutionsformen“ bedingte qualitative Verschiebung der Eiweißzusammensetzung war damit ausgeschlossen.

c) Zusammensetzung des Azotobaktereiweißes.

Bereits OMELIANSKY und N. O. SIEBER (1913) sowie GREENE (1935) und andere beschäftigten sich mit der chemischen Zusammensetzung von Azotobakter. GREENE bediente sich bei seiner Eiweißanalyse der VAN SLYKE-Methode, wobei charakteristische

Der sicherste Weg zur Identifizierung schien uns daher in der Beimengung von Testsubstanzen zum Hydrolysat zu liegen, um durch die Stärke der auftretenden Flecke eine Übereinstimmung festzustellen.

Die sorgfältige Prüfung der Hydrolysate sämtlicher eingangs erwähnter Azotobakterstämme erbrachte folgendes Ergebnis (vgl. Abb. 2):

Im Azotobaktereiweiß fanden wir bei allen Stämmen 17 Aminosäuren und einen Aminozyucker (Glukosamin). Die Art der C-Quelle änderte die qualitative Eiweißzusammensetzung nicht.

Die mit Buchstaben bezeichneten Flecke traten verschiedentlich bei den einzelnen Chromatogrammen immer wieder auf. Sie konnten mit den zur Verfügung gestandenen 28 Testaminozyuckern nicht identifiziert werden; einige von ihnen jedoch erschienen auch auf zweidimensionalen Testaminozyuckerchromatogrammen.

Zur Trennung von Leucin-Phenylalanin sowie Tryptophan und Valin wurden verschiedene Lösungsmittel erprobt. Leider führten diese Versuche zu keinem Erfolg, da sowohl Phenylalanin-Leucin als auch Tryptophan-Valin überall fast dieselbe Laufgeschwindigkeit aufwiesen. Aus eben demselben Grund konnte nicht festgestellt werden, ob es sich um Leucin oder Isoleucin handelt.

Farbreaktionen der einzelnen Aminosäuren mit verschiedenen Entwicklern.

Sämtliche Chromatogramme wurden zur Sichtbarmachung der Flecke mit dem Ninhydrinreagens besprüht. Dabei gaben α -Aminosäuren nach Erwärmung mit Ninhydrin eine intensive blaue oder violette, Prolin eine gelbe Färbung.

Besprühen mit Folins Reagens ergab folgendes Bild:

1 — Asparaginsäure	rötlich braun	12 — Prolin	leuchtend rosa
2 — Glutaminsäure	} grün	13 — Leucin	grau blau
4 — Glycin		15 — Tryptophan	braun
5 — Serin	} gelblich	16 — Valin	} bläulich bis grau
6 — Threonin		8 — Histidin	
7 — Alanin	grünl. blau	9 — Lysin	

Spezielle Nachweise wurden geführt für:

1. Tryptophan, mit EHRLICHs Reagens (salzsaure p-Dimethylaminobenzaldehyd-lösung): Rotfärbung bei 60° C nach 10 Min. Die mitgelaufene Testsubstanz zeigte dieselbe Farbreaktion.

Der Nachweis von Tryptophan, das bei der sauren Hydrolyse zum Teil zerstört wird, erscheint wichtig, da Untersuchungen von K. BURGER zeigten, daß Azotobakter durch Abbau von Tryptophan zur Wuchsstoffsynthese befähigt ist.

2. Tyrosin, mit einer alkoholischen Lösung von 0,1% α -Nitroso- β -Naphthol. Anschließend nach Trocknung im Warmluftstrom weitere Besprühung mit 10 proz. wässriger Salpetersäure. Nach Erhitzen auf 100° C erschien Tyrosin rot auf fahlgelbem Grund. Zur Kontrolle ließen wir eine Tyrosintestlösung mitlaufen, die sich in gleicher Weise anfärbte.
3. Prolin. Mit Ninhydrin gibt es eine gelbe Farbreaktion.
4. α , ϵ -Diaminopimelinsäure. Die Chromatographie erfolgte zweidimensional mit den Lösungsmitteln Isopropylalkohol und Pyridin. Nach Besprühen mit 0,1 proz. Ninhydrinlösung in Azeton und anschließender Trocknung (2 Min. bei 100° C) zeigte sich die α , ϵ -Diaminopimelinsäure in einer olivgrünen Farbe, die sich bald in leuchtendes Gelb verwandelte.

Die Aminosäure war in sehr geringer Konzentration in *Azot. chroococcum*¹⁾

¹⁾ Der Nachweis für *Azot. chroococcum* wurde von KANDLER und ZEHENDER (1955) bereits erbracht.

sowie *Azot. vinelandii* und *Azot. agile* vorhanden. Bei den Stämmen von *Azot. beijerinckii* und *Azot. indicum* gelang kein überzeugender Nachweis, wohl infolge äußerst geringer Mengen.

Cystein ist als Eiweißbaustein bei *Azotobakter* sehr wahrscheinlich anzunehmen, doch durch saure Hydrolyse ziemlich zerstört.

Unsere bisherigen Untersuchungen zeigten trotz verschiedener Kohlenstoffquellen keine qualitativen Unterschiede des *Azotobaktereiweißes*; die quantitative Zusammensetzung war nun noch zu prüfen.

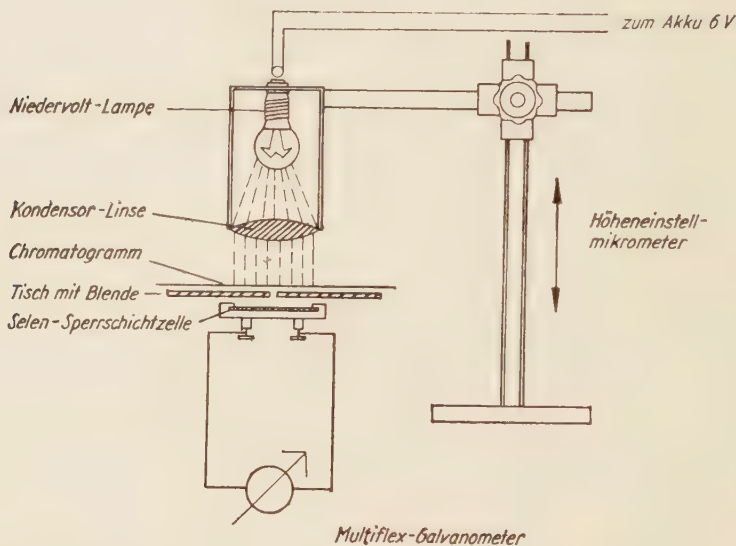


Abb. 3. Schema der Apparatur zur Messung der Fleckenintensität.

4. Quantitative Auswertung.

Schon OMELIANSKY und SIEBER (1913)¹⁾, GREENE (1935)¹⁾ und BURRIS (1942)¹⁾ versuchten die gefundenen Aminosäuren quantitativ festzulegen, doch zeigten sich hier sehr unterschiedliche Ergebnisse. Dies beruhte auf der Verwendung sehr umständlicher und unzulänglicher Methoden.

Auch die moderne Papierchromatographie hat noch keine ideale Methode zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren entwickelt. Eine Bestimmung mittels löslicher Ninhydrin-Kupferkomplexe auf kolorimetrischem Wege oder durch rein visuellen Vergleich mit Testkonzentrationsabstufungen schließt noch immer eine beachtliche Fehlergrenze ein, so daß ein genaues Erfassen kleiner Mengen schlecht möglich ist.

Deshalb war ein anderer Weg beschritten worden, der aber nur ein Mengenverhältnis der einzelnen Aminosäuren zueinander aufzeigt. Nach dieser Methode wurde der aus der Farbintensität der Ninhydrinflecke sich ergebende „Lichtwert“ in Beziehung zur Fleckengröße gebracht.

Zunächst wurde die Lichtdurchlässigkeit der einzelnen Farbflecke mit Hilfe einer Photozelle (LANGE, Typ S 20) gemessen, die mit einem Multiflex-Galvanometer Typ MG F 2 gekoppelt war (Abb. 3). Um Stromschwankungen zu vermeiden, wurde die Lichtquelle (Niedervoltlampe) mit einem Akkumulator gespeist.

¹⁾ Zitiert nach CAMIEN u. Mitarb. (1945).

Der Photostrom entspricht der Lichtdurchlässigkeit der einzelnen Flecke. Die Blende des Tisches war so gewählt worden, daß auch der kleinste Fleck sie noch vollkommen bedeckte. ($\varnothing = 10$ mm).

Es wurden nun von den einzelnen Hydrolysaten Chromatogramme hergestellt. Mit einer präzis geeichten Elphor-Pipette gaben wir genau 0,05 ml Extrakt auf das Papier, was einer Bakterientrockenmasse von 1 mg entsprach. Als Lösungsmittel diente α -Picolin/Phenol. Nach sorgfältiger Trocknung wurden die Chromatogramme reichlich mit Ninhydrin besprüht, um maximale Farbreaktionen zu erreichen.

Die Entwicklungszeit war stets dieselbe, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Sodann wurde der Blindwert des Papiers bei jedem Chromatogramm auf gleichem Galvanometerausschlag (= 100) festgelegt; dies erfolgte durch Höhenverstellung der Lampe.

Die Zahl, die sich aus der Differenz von Flecken- und Blindwert ergab, multiplizierten wir mit der Fleckengröße, die mit Hilfe eines Planimeters sorgfältig bestimmt worden war.

Es ergab sich die Größe M nach folgender Berechnung:

$$M = k \cdot l \cdot f$$

k = Proportionalitätsfaktor,

l = errechneter Lichtwert (aus Blindwert minus Fleckenwert),

f = Fleckengröße.

Diese Zahlen hängen zwar mit der Aminosäurekonzentration zusammen, gestatten aber mangels mathematisch exakter Entwicklung der Formel keine Errechnung der Absolutwerte in Gamma. Um aber die Mengenverhältnisse der Eiweißkomponenten zueinander bestimmen zu können, ließen wir unter genau den gleichen Bedingungen wie bei dem Hydrolysat die in Betracht kommenden Aminosäuren in vier verschiedenen Konzentrationen im Chromatogramm laufen

1. 6,25 γ

2. 12,5 γ

3. 25 γ

4. 50 γ

Die Flecken wurden dann in gleicher Weise entwickelt und photo- und planimetrisch vermessen. So konnten Eichkurven gewonnen werden, die der Auswertung der Hydrolysatchromatogramme zugrunde gelegt wurden.

Die Eichkurven (Abb. 4) enthalten auf der Abszisse den Wert M, auf der Ordinate die jeweils dazugehörigen vier verschiedenen Ausgangsmengen aufgetragen.

Sämtliche Kurven, ausgenommen die des Histidins, zeigen im Prinzip denselben Krümmungsverlauf. Sie konnten durch Unsicherheit des Wertes M leider nicht für alle Aminosäuren aufgestellt werden.

Aus den Eichkurven wurde die jeweilige Menge der einzelnen Aminosäuren des Hydrolysates abgelesen (vgl. Abb. 5).

Diese Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Sämtliche Azotobakterstämme weisen Unterschiede in der quantitativen Aminosäurezusammensetzung auf und zwar sowohl untereinander als auch in bezug zu den einzelnen C-Quellen.
2. Die Verschiedenartigkeit in der Größe der Bakterienzellen bei den einzelnen Azotobakterstämmen dürfte keine wesentliche Rolle für diese Unterschiede spielen: *Azot. agile* und *Azot. vinelandii* (St. BKL 1) ähneln sich in ihrem morphologischen Bau sehr, sind jedoch hinsichtlich ihrer quantitativen Aminosäurezusammensetzung sehr verschieden.

Eichkurven

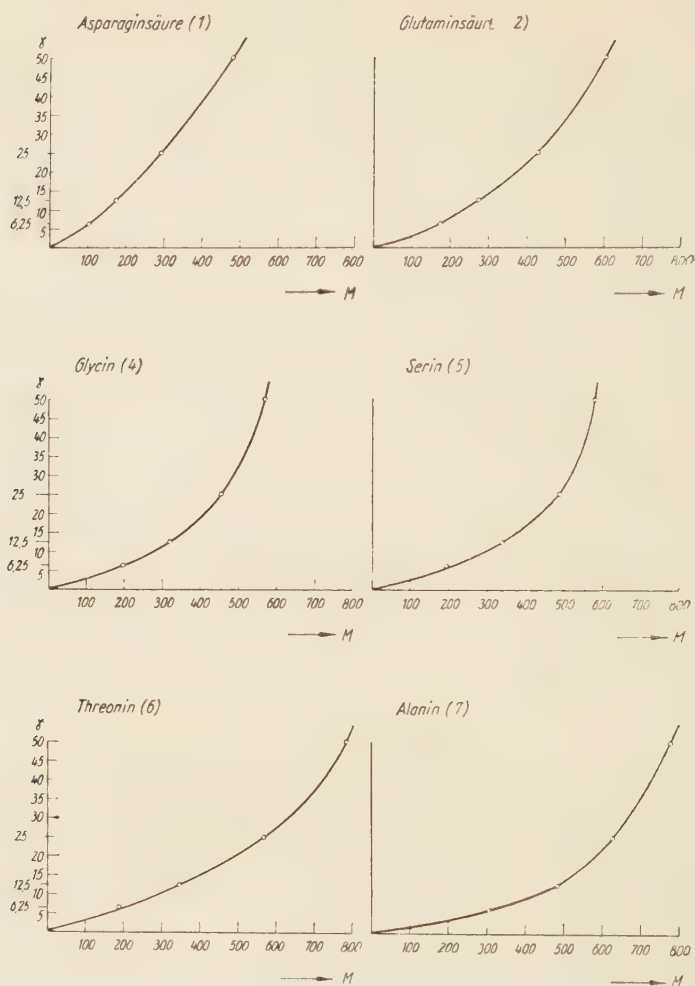


Abb. 4a.

- Bei den meisten Stämmen stehen neben Alanin mengenmäßig Asparaginsäure und Glutaminsäure an der Spitze, was bei ihrer Bedeutung im Stoffwechselgeschehen durchaus verständlich ist.

Auffallend ist die hohe Konzentration von Glutaminsäure und Alanin bei Stamm *Viola* auf Azetat.

- Das relative Mengenverhältnis der einzelnen Aminosäuren zeigt bei *Azot. agile* auf allen C-Quellen Alanin und Glutaminsäure an erster und zweiter Stelle (bei Propionat als C-Quelle neben Alanin noch Histidin). Der *Azot. chroococcum*-Stamm ATCC 4412 weist im Gegensatz zu den übrigen Stämmen auf Azetat und Propionat einen relativ

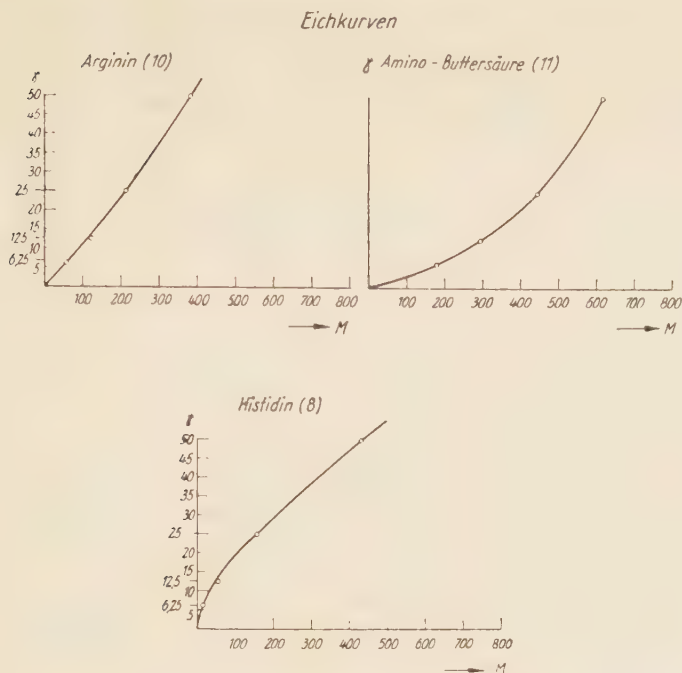


Abb. 4b.

hohen Anteil an Glycin und einen relativ niederen Anteil an Threonin auf.

5. Die niedermolekularen Kohlenstoffgerüste scheinen im allgemeinen besser zum Aufbau des arteigenen Eiweißes verwertet zu werden als die höhermolekularen, wie die Abbildungen zeigen.
6. Der geringe Aminosäuregehalt bei Stamm *Triticum* dürfte wohl dadurch bedingt sein, daß der Bakterienkörper im Verhältnis zur Schleimhülle äußerst klein ist und bei Bezug auf die Gesamttrockenmasse wenig ins Gewicht fällt.

B. Untersuchung der Nährlösung.

1. Abscheidung freier Aminosäuren in die Nährlösung

KRZEMIENIEWSKY und LIPMAN fanden in den Filtraten von *Azotobakter*kulturen Stickstoffverbindungen; MOLER (1917) konnte sie nur bei *Azot. vinelandii* und *Azot. agile* in der Kulturlösung nachweisen, dagegen nicht bei *Azot. chroococcum*. VIRTANEN u. Mitarb. (1937) untersuchten Ausscheidung von Stickstoffverbindungen bei Knöllchenbakterien.

Den eigenen Versuchen lag folgende Fragestellung zugrunde:

- a) Geben unsere Stämme überhaupt Aminosäuren in die Kulturlösung ab? Ist die Abscheidung abhängig von der jeweiligen C-Quelle oder ist sie stammspezifisch?
- b) Sind diese Aminosäuren Autolyseprodukte oder werden sie aktiv durch die Bakterien in die Nährlösung ausgeschieden?

Zur Anzucht wurden 300 ml Nährlösung geimpft mit allen vier *Azot. chroococcum*-Stämmen, mit *Azot. agile* und *Azot. vinelandii*, mit dem *Azot. beijerinckii*-Stamm Triticum und den beiden *Azot. indicum*-Stämmen.

Als Kohlenstoffquellen dienten Mannit (2%), Na-Azetat, Na-Propionat, Na-Succinat (je 1%) sowie Na-Benzoeat (0,5%). Die Kulturdauer betrug 6 Tage, bei den drei letztgenannten Azotobakterstämmen 14 Tage.

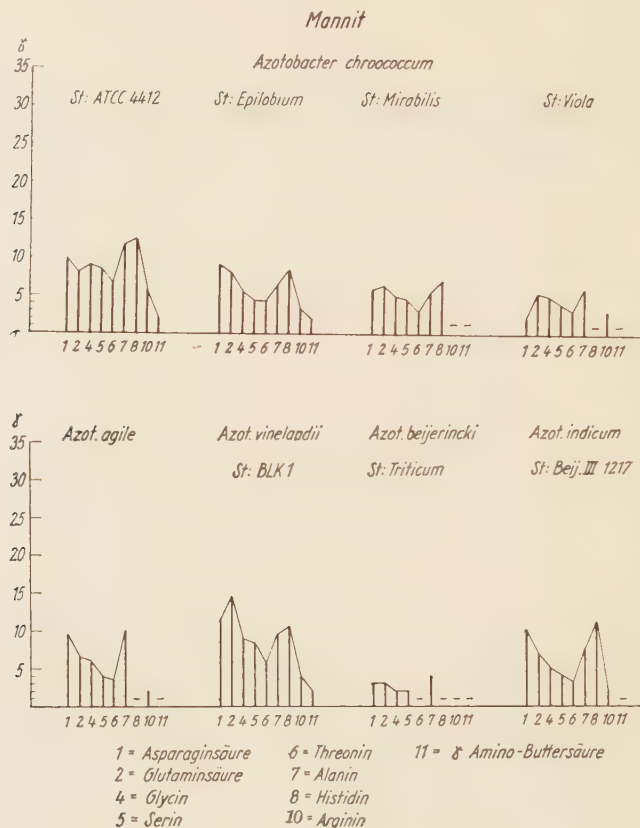


Abb. 5a.

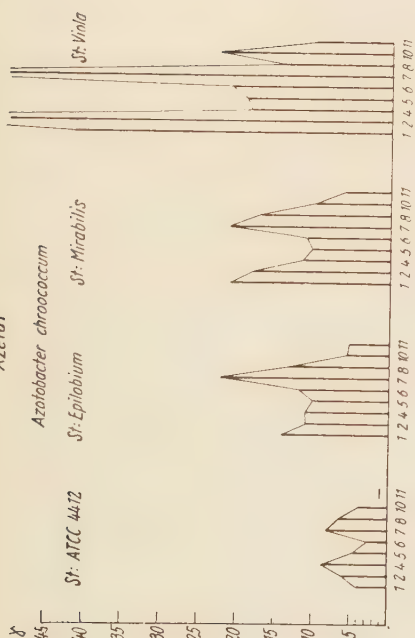
Der von RIPPEL (1936) empfohlene Zusatz zur Nährlösung von geringen Agarmengen zur Erzielung besseren Wachstums wurde nicht angewandt, um die folgenden Untersuchungen der Kohlenhydrate nicht zu beeinträchtigen.

Im allgemeinen ergab sich das in Tab. 4 aufgezeigte Bild.

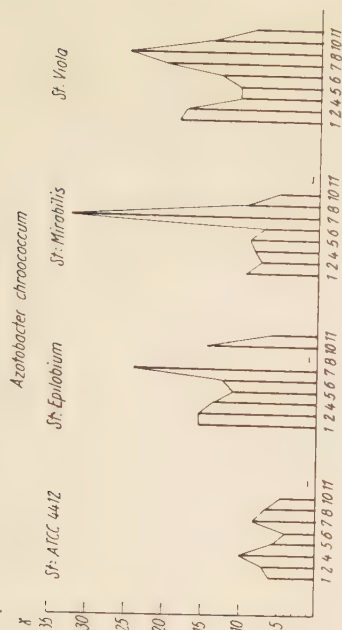
Die leichte Trübung der Nährlösungen in einigen Fällen wurde durch erhöhte Schleimbildung hervorgerufen. Der Schleim des Stammes ATCC 4412 auf Mannit zeigte mehr gallertigen Charakter, während die beiden *Azot. indicum*-Stämme einen ausgesprochen zähflüssigen Schleim absonderten. Zur besseren Abtrennung der Bakterien wurde in diesen Fällen länger und mit erhöhter Umdrehungszahl zentrifugiert.

Die Nährlösungen filtrierten wir nach dem Zentrifugieren nochmals und verarbeiteten sie zur Gewinnung der alkoholischen Extrakte nach der oben angegebenen Me-

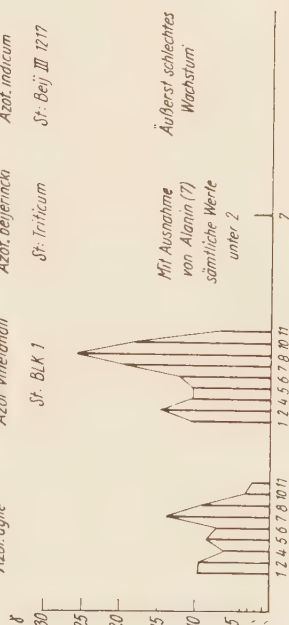
Azetat



Propionat

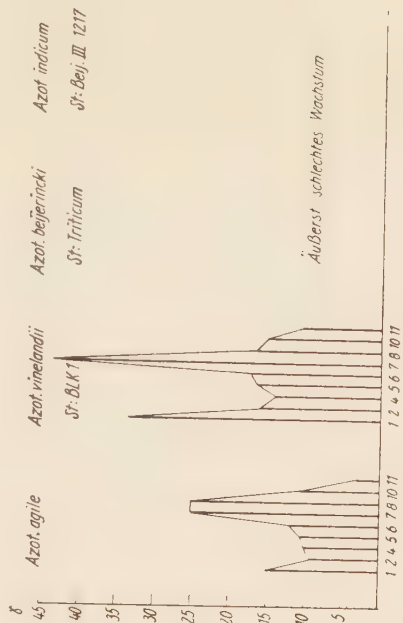


Azot. agile



Mit Ausnahme von Alanin (7) sämtliche Werte unter 2

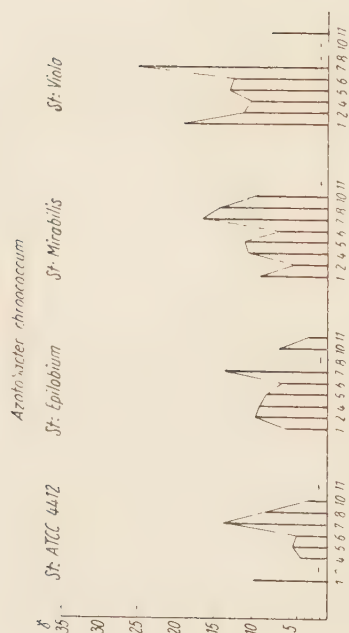
Abb. 5b.



Äußerst schlechtes Wachstum

Abb. 5c.

Succinat



Benzot

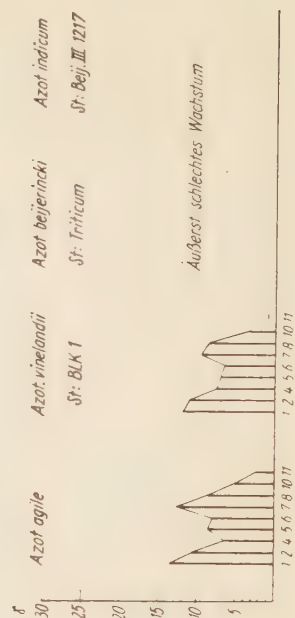
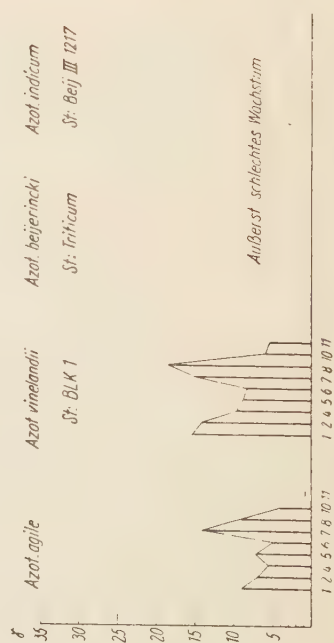
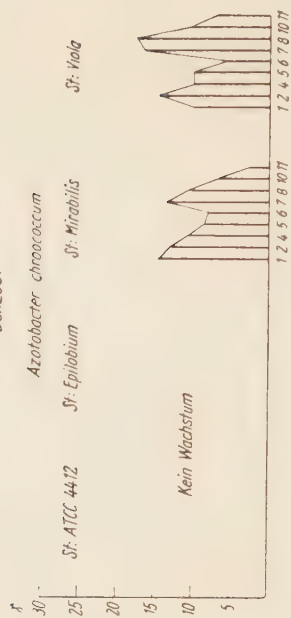


Abb. 5d.

Abb. 5e.

Tabelle 4.

Stamm	C-Quelle	Wuchs	Kulturlösung klar +, trüb —
ATCC 4412	Mannit	sehr gut	+ (—)
	Azetat	gut	+
	Propionat	gut	+
	Succinat	gut	+
Epilobium	Mannit	sehr gut	+
	Azetat	mittel	+
	Propionat	gut	+
	Succinat	gut	+
Mirabilis	Mannit	sehr gut	—
	Azetat	mittel	+
	Propionat	gut	+
	Succinat	schlecht	+
	Benzoat	gut	+
Viola	Mannit	sehr gut	+
	Azetat	mittel	+
	Propionat	gut	+
	Succinat	mittel	+
	Benzoat	mittel	+
<i>Azot. agile</i>	Mannit	sehr gut	(+) —
	Azetat	mittel	+
	Propionat	gut	+
	Succinat	mittel	+
	Benzoat	gut	+
BLK 1	Mannit	sehr gut	+
	Azetat	mittel	+
	Propionat	gut	+
	Succinat	mittel	+
	Benzoat	gut	+
Triticum	Mannit	schlecht	—
	Azetat	mittel	—
Beijerinckia 1216	Mannit	sehr gut	—
Beijerinckia 1217	Mannit	sehr gut	—

thode. Die Auftrennung der Aminosäuren erfolgte in ein- und zweidimensionaler Chromatographie, zur Erfassung auch geringer Konzentrationen wurden verschiedene Mengen aufgetragen.

Tab. 5 zeigt eine Zusammenstellung der in der Kulturlösung von Azotobakterstämmen gefundenen freien Aminosäuren.

Die Identifizierung erfolgte hauptsächlich durch verschiedene, dem alkoholischen Extrakt beigegefügte reine Lösungen von Testsubstanzen.

In Tab. 5 wurden diejenigen Aminosäuren mit Klammer versehen, die nicht eindeutig nachzuweisen waren.

Der mit A bezeichnete Zusatzfleck befand sich auch auf zweidimensionalen Chromatogrammen jeweils etwas über der Glutaminsäure, d. h. also, daß die uns unbekannte Substanz in α -Picolin wenig, in Phenol dagegen fast überhaupt nicht lief. Mit Ninhydrin ergab Fleck A mehr eine ins rötlich gehende Farbreaktion, seine Konzentration war z. T. beträchtlich.

Tabelle 5.

Stamm	C-Quelle	Asparagin- säure	Glutamin- säure	Glycin	Serin	Threonin	Amino- Alanin
		1	2	4	5	6	7
ATCC 4412	Azetat		+	(+)			
	Propionat		+				
	Succinat		+				
	Mannit, 20 St.		+				+
	45 St.		+				+
Epilobium	Mannit	+	+				(+)
	Azetat	+	+	+			+
	Propionat	+	+				
	Succinat	+	+	+			
Mirabilis	Mannit	+	(+)				
	Azetat	+	+	+			+
	Propionat	+	+	(+)			+
	Succinat	+	+				+
	Benzoat	+	+	+			(+)
Viola	Mannit	+	+				+
	Azetat	+	+				
	Propionat	+	+	+			
	Succinat	+	+	+			+
	Benzoat	+	+	+	+		+
<i>Azot. agile</i>	Mannit	(+)	+				+
	Azetat		+	+			+
	Propionat	+	+				(+)
	Succinat		+	(+)			+
	Benzoat		+				
BLK 1	Mannit	+	+				+
	Azetat	+	+	+	(+)		+
	Propionat	+	+	+			+
	Succinat	+	+	+			+
	Benzoat	+	+				(+)
Triticum	Mannit	+	+				
	Azetat	+					
Beijerinckia 1216	Mannit						Keine sichtbare
Beijerinckia 1217	Mannit						freier

Die Prüfung auf freie Aminosäuren erfolgte zunächst aus Nährlösungen mit einer Kulturdauer von 6 Tagen. Durch die relativ kurze Anzuchtzeit sollte eine Beeinflussung durch Stoffe, die möglicherweise von älteren Kulturen in die Nährlösung abgegeben worden waren, vermieden werden. Die Inkubationszeit der langsam wachsenden *Azot. indicum*-Stämme und des Triticum-Stammes (*Azot. beijerinckii*) betrug jedoch mindestens 14–16 Tage. 14 tägige Kultur auch der übrigen Stämme änderte nichts am Ergebnis.

In allen Fällen wurde festgestellt, daß die Aminosäureabscheidung der auf Mannit gewachsenen Stämme sehr gering war.

säuren												Zusatz- flecke
Histidin	Lysin	Arginin	γ ABS	Prolin	Leucin	Phenyl- alanin	Tryptophan	Valin	Tyrosin	Glukosamin		
8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
					+	+	+	+				A
					+	+	+	+				A
					+	+	+	+				A
	(+)				+	+	(+)	(+)				
					+	(+)	+	+	+			A
					+	+	+	+				A
												A
	+	(+)			+	+	+	+	+			B
	+	(+)			+	+		+				
	(+)				+	+	+	+	(+)			B
												A
												A
												A
	(+)				+	+	+	+	(+)			B
					+	+	+	+				A
					+	+	(+)	(+)				A, B
												A
Reaktion auf Abscheidung												A
Aminosäuren												

Bei den Stämmen *Beijerinckia* III 1216 und III 1217 konnten trotz verlängerter Wachstumszeit keine Aminosäuren im Filtrat nachgewiesen werden.

Bei allen übrigen Stämmen war Glutaminsäure in der Nährlösung zu finden; Asparaginsäure und Alanin verhältnismäßig häufig. Bei Mannit oder Benzoat als Kohlenstoffquelle wies kein Stamm Leucin, Phenylalanin, Tryptophan und Valin auf. Das wiederholte Auftreten von Glutaminsäure und Asparaginsäure sowie Alanin mag seine Ursache darin haben, daß diese Aminosäuren im Stoffwechselzyklus ständig gebildet werden bzw. durch Transaminierung sehr leicht entstehen können.

2. Aktive Aminosäureausscheidung durch Bakterien

Das Vorhandensein von Aminosäuren in den Nährlösungen der verschiedenen Azotobakterstämme führt zur Prüfung der Frage, ob die Aminosäuren durch Autolyse oder durch aktive Ausscheidung der Bakterien in das Filtrat gelangen. Es dürfte aber schwierig sein, einen eindeutigen Nachweis

dieser oder jener Annahme zu erbringen, da wahrscheinlich beide Vorgänge nebeneinander laufen.

Um eine aktive Aminosäureausscheidung durch Azotobakter zu untersuchen, setzten wir zur möglichsten Vermeidung von Autolyse eine äußerst kurze Kulturdauer fest. Wir wählten den raschwüchsigen Stamm ATCC 4412 und beimpften damit je 300 ml Mannit-Kulturlösung. Die Fernbach-Kolben standen bei einer Temperatur von ca. 28° C 20 Std. bzw. 45 Std. auf der Schüttelmaschine. Ein Wachstum war nach 20 Std. bereits gut sichtbar.

Nach dem Zentrifugieren erfolgte die Weiterverarbeitung der Nährlösungen wie bei den vorangegangenen Untersuchungen. Der alkoholische

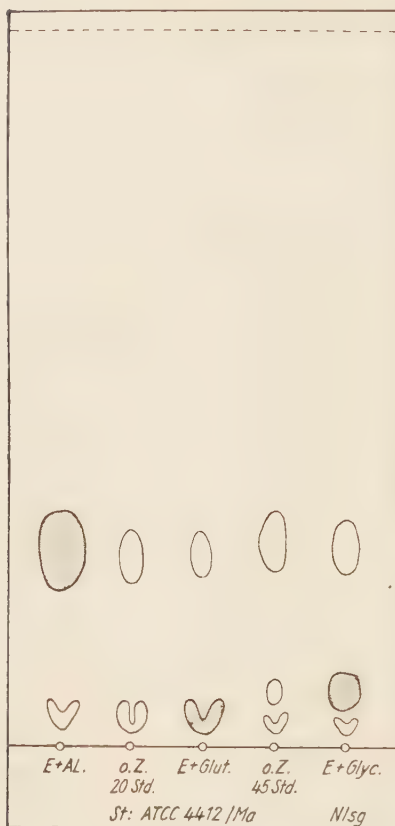


Abb. 6. Prüfung auf Aminosäuren in der Nährlösung des Stammes ATCC 4412 mit Mannit als C-Quelle. Von links nach rechts: E + Al = alkoh. Extrakt + Alanin als Zugabe; o.Z. 20 Std. = alkoh. Extrakt ohne Zugabe, Kulturdauer 20 Std.; E + Glut. = alkoh. Extrakt + Glutaminsäure als Zugabe; o.Z. 45 Std. = alkoh. Extrakt ohne Zugabe, Kulturdauer 45 Std.; E + Glyc. = alkoh. Extrakt + Glycin als Zugabe.

Extrakt wurde in ziemlicher Menge in α -Picolin aufsteigend chromatographiert.

Zur Identifizierung der schwachen mit Ninhydrin entstandenen Flecke trugen wir auf dem Chromatogramm nebeneinander gleiche Portionen des alkoholischen Extraktes auf, wobei eine Probe ohne Zusatz blieb, während den übrigen die in Frage kommenden Testamino-säuren zugesetzt wurden. Die jeweiligen Flecke zeigten dann gegenüber den Vergleichsflecken der Blindprobe größere räumliche Ausdehnung und stärkere Konzentration (Abb. 6).

Abb. 6 zeigt ein derartiges Chromatogramm.

Die Rf-Werte sind relativ niedrig, da die eingeengte Nährlösung noch ziemlich viel an unverbrauchter Substanz enthielt, die leider nicht restlos aus dem alkoholischen Extrakt zu entfernen war.

Dabei fanden wir bei einer Kulturdauer von 20 Std. Glutaminsäure und Alanin; bei einer Kulturdauer von 45 Std. außerdem Glycin.

Die in einer Arbeit von VIRTANEN u. Mitarb. (1937) in zellfreien Filtraten von 2½ bis 3 Tage alten *Azotobakter*kulturen beschriebene Asparaginsäure konnte in unseren jungen Kulturen nicht nachgewiesen werden. Nach einem längeren Wachstum ist jedoch eine Ausscheidung dieser Aminosäure durchaus möglich. Eine weitere Untersuchung bezüglich dieser Frage unterblieb, da für unsere Arbeit lediglich die Tatsache von Interesse war, daß auch bei jungen Kulturen Aminosäuren in der Nährlösung vorhanden sind, was eine aktive Ausscheidung durch die Bakterien vermuten läßt; Autolyse ist aber nicht völlig auszuschließen.

3. Abscheidung von Zuckern in die Nährlösung

Im folgenden Teil unserer Arbeit untersuchten wir die einzelnen *Azotobakter*filtrate auf ihren Gehalt an Kohlenhydraten. Von Interesse war für uns zunächst die Frage, ob *Azotobakter* Mono- oder Disaccharide in die Kulturlösung abscheidet.

Die Untersuchungen wurden an den Stämmen *Mirabilis*, ATCC 4412, BLK 1 und *Beijerinckia* III 1217 vorgenommen. Als Kohlenstoffquelle dienten entweder Mannit, Na-Azetat, Na-Propionat, Na-Succinat oder Na-Benzoesäure; Kulturdauer 6 Tage.

Die Chromatographie des alkoholischen Extraktes erfolgte eindimensional aufsteigend in Isopropanol-Wasser-Eisessig (70—20—10). Anilinphthalat diente als Sprühreagens. Die *R_f*-Werte der Zucker wurden mit Hilfe einer Reihe von Testsubstanzen festgelegt.

Trotz Verwendung stärkerer Konzentrationen des alkoholischen Extraktes führten die Versuche zu keinen eindeutigen Ergebnissen: Freie Zucker konnten im Filtrat nicht nachgewiesen werden. Nur bei BLK 1 und *Beijerinckia* III 1217 auf Mannit fanden sich Spuren, die bei Stamm *Beijerinckia* III 1217 auf Glukose hindeuteten; bei BLK 1 dürfte außerdem eine Uronsäure auftreten.

4. Einfluß verschiedener Kohlenstoffquellen auf die Zusammensetzung des Bakterien Schleimes

Der Zellkörper vieler Bakterien ist von einer Schleimschicht, der sogenannten Kapsel, umhüllt, die entweder aus Polysacchariden, aus Polypeptiden oder aus beiden aufgebaut ist (TOMCSIK und S. GÜEX HOLZER 1954). Die Dicke dieser Kapsel ist sehr verschieden und hängt neben Wachstumsbedingungen auch von der Art des Organismus ab (diesbezüglich bemerkenswerte Unterschiede einzelner *Azotobakter*stämmen zeigt Taf. II am Schluß dieser Arbeit).

Die Bakterien sind außerdem von einem lockeren Schleim umgeben, der nach Arbeiten von WILKINSON u. Mitarb. (1954) bei *Aerobacter*- und *Escherichia*-Stämmen aus Polysacchariden besteht, deren Produktion im Medium durch beschränkte Stickstoff- und reichliche Kohlenhydratgabe bedeutend erhöht werden konnte.

Unsere Untersuchungen sollten nun zunächst die Frage der Zusammensetzung des *Azotobakter*schleimes klären. Wie eingangs bereits erwähnt, berichtete schon STAPP (1924), daß der von *Azotobakter* gebildete Schleim aus einem kohlenhydratartigen Stoff besteht, der bei der Inversion einen rechtsdrehenden, vergärbaren Zucker ergibt und frei von eiweiß- oder mucinartigen Stoffen ist.

LAWSON und STACEY (1954) fanden bei *Azot. chroococcum* als Substanz der Schleimschicht ein Polysaccharid, das aus Glukose, Galaktose, Glukuronsäure, Mannose und einem „noch nicht bekannten Zucker“ aufgebaut ist.

Diese und noch andere Untersuchungen (COOPER u. Mitarb. 1938, OMELIANSKY u. Mitarb. 1913, DUGUID 1948) lassen erkennen, daß der von *Azotobakter* gebildete Schleim aus Polysacchariden besteht.

Unsere Untersuchungen wurden durchgeführt mit den vier *Azot. chroococcum*-Stämmen, *Azot. agile*, *Azot. vinelandii* (St. BLK 1), den je beiden *Azot. indicum*- und *Azot. beijerinckii*-Stämmen.

Der Nährlösung (je 300 ml) von üblicher Zusammensetzung wurden wieder jeweils getrennt die fünf Kohlenstoffquellen zugesetzt. Die Anzucht erfolgte 6 Tage lang auf der Schüttelmaschine. Es wurde durch wiederholtes Zentrifugieren ein zellfreies Filtrat erhalten und dieses anschließend bei ca. 60° C weitgehend eingeeengt.

Der pH-Wert des Filtrates verhielt sich je nach Beschaffenheit der von den Bakterien verwerteten C-Quelle verschieden. Bei Zusatz von Alkalisalzen organischer Säuren (Na-Propionat, Na-Succinat, Na-Azetat, Na-Benzoesäure) entstanden beim Abbau dieser organischen Salze Karbonate, die als Alkalikarbonate in Lösung blieben und daher den alkalischen Charakter dieser Filtrate bedingten.

Wurde Mannit als C-Quelle verwendet, so lag der pH-Wert beim Neutralpunkt, mit einer Tendenz ins saure (pH 6—7) (siehe Tab. 6). Den stark eingeeengten Nährlösungen setzten wir 10 ml aq. dest. zu und brachten die alkalischen Filtrate mit verdünnter Salzsäure auf pH = 7,0.

Bei Zusatz einer reichlichen Menge absoluten Alkohols zur neutralen Lösung zeigte sich zunächst bei allen Stämmen ein in seiner Konsistenz sehr verschiedenartiger Niederschlag.

Bei vielen Proben war die Fällung weiß bis elfenbeinfarbig und körnig. Diese Beschaffenheit ließ einen Konzentrationsniederschlag des in der Nährlösung verbliebenen Calciumhydrogencarbonates $[\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2]$ vermuten: Bei Zugabe von 2 n H_2SO_4 zur Hydrolyse löste sich der Niederschlag sofort unter starker CO_2 -Entwicklung auf, ein verbleibender minimaler Rest wurde hydrolysiert, ergab jedoch bei der anschließenden Chromatographie keinen Zuckernachweis.

Der Niederschlag, der sich bei den Stämmen ATCC 4412, BLK 1 und *Azot. agile* durch Alkoholzugabe zeigte, war flockig weiß mit leicht bräunlicher Färbung und gallertig. Nach dem Trocknen löste er sich bei Säurezugabe nicht auf. Zucker konnten hier, wie noch ausgeführt wird, eindeutig nachgewiesen werden.

Die Art der dargebotenen Kohlenstoffquelle hat keinen Einfluß auf die Bildung eines Niederschlages durch Alkoholzugabe. Es ist das eine Stammspezifität und zwar charakteristisch für die Stämme ATCC 4412, BLK 1 und *Azot. agile* (Tab. 6).

Die Nährlösung der übrigen Stämme wurde nach Neutralisation vorsichtig getrocknet und dann in Reagensgläsern mit 5—8 ml 2 n H_2SO_4 überschichtet. Die Hydrolyse erfolgte im zugeschmolzenen Reagensglas bei 100° C während 3 Std. Der saure Extrakt wurde nach dem Erkalten mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ p. a. neutralisiert, der hierauf gebildete Niederschlag mehrmals mit warmem Aqua dest. gewaschen, das Waschwasser mit dem Hydrolysat vereint.

Die Konzentrierung des Hydrolysates erfolgte im Vakuum, in einem Wasserbad von ca. 80° C. Zum Trockenrückstand gaben wir 5 ml 70 proz. Äthylalkohol. Die Extraktion wurde im Eisschrank für eine Zeit von 48—72 Std. durchgeführt.

Den so gewonnenen Extrakt, auf ein Volumen von 2 ml im Warmluftstrom eingeeengt, verwendeten wir zur Zuckerbestimmung. Der von den Stämmen ATCC 4412, BLK 1 und *Azot. agile* bei Alkoholzusatz gebildete Niederschlag wurde in gleicher Weise der Säurehydrolyse unterworfen (2—12 Std.).

Wir prüften auch die Nährlösungen dieser drei Azotobakterstämme ohne vorherige Ausfällung durch Alkohol auf die Zusammensetzung des Azotobakterschleimes. Im Endergebnis zeigte sich gegenüber dem Niederschlag kein Unterschied in der chemischen Beschaffenheit.

Der Nachweis von Zucker erfolgte mit Hilfe der Papierchromatographie und zwar sowohl ab- als auch aufsteigend, ein- und zweidimensional.

Nach LINSKENS (1955) wurden zur besseren Trennung der Zucker die Bögen bis auf schmale Stege, die den Startfleck trugen, ausgeschnitten.

Da die Laufgeschwindigkeit in der Mitte größer war als an den Rändern, zeigten sich nach der Entwicklung halbmondförmige Flecke der einzelnen Zucker.

Tabelle 6.

Stamm	C-Quelle	Wuchs	pH der Nährlösung am Ende d. Kulturzeit	gebildeter Niederschlag durch Alko- holzusatz
ATCC 4412	Mannit	sehr gut	6	+
	Azetat	gut	9	+
	Propionat	gut	9	+
	Succinat	gut	9	+
Epilobium	Mannit	sehr gut	6	—
	Azetat	mittel	9	—
	Propionat	gut	9	—
	Succinat	gut	9	—
Viola	Mannit	sehr gut	7	—
	Azetat	mittel	9	—
	Propionat	gut	9	—
	Succinat	schlecht	9	—
	Benzoat	mittel	8	—
Mirabilis	Mannit	sehr gut	6,5	—
	Azetat	schlecht	9	—
	Propionat	gut	9	—
	Succinat	schlecht	8—9	—
	Benzoat	gut	8—9	—
BLK 1	Mannit	sehr gut	6	+
	Azetat	mittel	9	+
	Propionat	gut	9	+
	Succinat	gut	9	+
	Benzoat	gut	8—9	+
<i>Azot. agile</i>	Mannit	sehr gut	6	+
	Azetat	mittel	9	+
	Propionat	gut	9	+
	Succinat	mittel	9	+
	Benzoat	gut	8	+
Beijerin. 1216	Mannit	sehr gut	7	—
Beijerin. 1217	Mannit	sehr gut	6,5—7	—
Taraxacum	Mannit	mittel	6,5—7	—
Triticum	Mannit	mittel	6,5—7	—

+ durch Zugabe absoluten Alkohols entstand in den hier angeführten Fällen ein flockiger, in verdünnter Säure unlöslicher Niederschlag.
 — nur $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ -Fällung durch Alkohol.

Eine zufriedenstellende Trennung der Zucker, die sich nur durch die Stellung ihrer OH-Gruppen unterscheiden, sonst aber die gleiche Anzahl von C-Atomen aufweisen, ist sehr schwierig. Nach Prüfung verschiedenster Lösungsmittel erwiesen sich Isopropylalkohol-Wasser-Eisessig (70—20—10) (1. Richtung) und Phenol (80 proz.) (2. Richtung) als die geeignetsten.

Nach Besprühen mit Anilinphthalat wurden die Chromatogramme ca. 10—15 Min. im Thermostaten bei 90° C getrocknet. Die meist braunen Zuckerflecke zeigten im UV-Licht eine charakteristische Fluoreszenz.

T a b e l l e 7.

Stamm	C-Quelle	Glukose	Galaktose	Mannose	Glukuron- säure	Rhamnose	Glukosamin
ATCC 4412	Mannit	+	+	+	+	+	+
	Azetat	+	+	+	+	+	+
	Propionat	+	+	+	+	+	+
	Succinat	+	+	+	+	+	+
Epilobium	Mannit	+	Sp	Sp	+	+	+
	Azetat	+	Sp	Sp	+	+	
	Propionat	+	Sp	Sp	+	+	
	Succinat	+	Sp	Sp	+	+	
Viola	Mannit	+	Sp	Sp	+	+	+
	Azetat	+	Sp	Sp	+	+	
	Propionat	+	Sp	+	+	+	
	Succinat	+	Sp	+	+	+	
	Benzoat	+	Sp	Sp	+	+	
Mirabilis	Mannit	+	+	+	+	+	+
	Azetat	+	Sp	Sp	+	+	
	Propionat	+	Sp	Sp	+	+	(+)
	Succinat	+	Sp	Sp	+	+	
	Benzoat	+	Sp	Sp	+	+	
BLK 1	Mannit	+	+	+	+	+	+
	Azetat	+	Sp	Sp	+	+	+
	Propionat	+	Sp	Sp	+	+	+
	Succinat	+	Sp	Sp	+	+	+
	Benzoat	+	Sp	Sp	+	+	+
<i>Azot. agile</i>	Mannit	+	+	+	+	+	+
	Azetat	+	+	+	+	+	+
	Propionat	+	+	+	+	+	+
	Succinat	+	+	+	+	+	+
	Benzoat	+	+	+	+	+	+
Beij. 1216	Mannit	+	+	+	+	+	+
Beij. 1217	Mannit	+	+	+	+	+	+
Taraxacum	Mannit	+	Sp	Sp	+	—	
Triticum	Mannit	+	Sp	Sp	+	—	

Sp = Spur.

Glukosamin, als Aminosucker, konnte nicht bei allen Stämmen nachgewiesen werden (vgl. Tab. 7).

In besonders großer Konzentration trat Glukose bei den Stämmen Beijerinckia III 1216 und III 1217 (*Azot. indicum*) sowie auch bei Stamm Taraxacum (*Azot. beijerincki*) auf. Die beiden erstgenannten enthielten außerdem relativ wenig Rhamnose.

Durch Zugabe der verschiedenen C-Quellen ergaben sich qualitativ keine Unterschiede in der Zusammensetzung des Azotobakterschleimes.

Eine quantitative Erfassung der Polysaccharidbausteine unterblieb, da durch unterschiedliches Wachstum der Stämme und unzureichende Methoden keine präzise Aussage möglich gewesen wäre.

Galaktose und Mannose traten meist in sehr geringen Konzentrationen auf. Ihr sicherer Nachweis machte deshalb Schwierigkeiten, weil Glukose in den meisten Fällen in reichlicher Menge vorhanden war und so die exakte papierchromatographische Trennung trotz Anwendung verschiedenster Lösungsmittel sehr erschwert wurde.

Elektrophoretische Trennung von Zuckern als Borsäureester [nach L. JAENICKE u. Mitarb.¹⁾ mit Boratpuffer] erbrachte keine besseren Ergebnisse.

Der von Azotobakterstämmen gebildete Schleim ist sehr wahrscheinlich aus Mucopolysacchariden aufgebaut, d. h. aus hochmolekularen Stoffen, die als Bausteine neben den einfachen Zuckern noch Aminosucker und Uronsäuren enthalten. Über die Verknüpfung dieser Zucker ist bis heute relativ wenig bekannt. Nach LAWSON und STACEY (1954) ist das bei *Azot. chroococcum* untersuchte Polysaccharid in seinem molekularen Bau sehr verzweigt und in seiner Struktur ähnlich dem Polysaccharid des serologisch verwandten *Rhizobium*.

5. Abscheidung fluoreszierender Stoffe in die Nährlösung

Die zellfreie Nährlösung unserer Azotobakterkulturen zeigte im UV-Licht ausnahmslos eine Fluoreszenz, deren Farbtönung bei einzelnen Stämmen verschieden war; die unbeimpfte Kulturlösung fluoreszierte nicht.

Im Tageslicht waren die Filtrate mehr oder weniger gelb gefärbt; auffallend goldgelb mit Benzoat als Kohlenstoffquelle, unabhängig davon, mit welchem Stamm beimpft worden war.

Es ist möglich, daß die Ringstruktur des Benzoats dem hier gebildeten Farbstoff zugrunde liegt. Vielleicht ist er als Melanin-Vorstufe anzusprechen. Bei Stamm. Viola mit Mannit als C-Quelle war die Nährlösung leicht altrosa, bei den Stämmen Mirabilis, BLK 1 und *Azot. agile* (ebenfalls auf Mannit gewachsen) gelbgrün gefärbt.

Tab. 8 zeigt eine Zusammenfassung dieser Beobachtungen. Durch Versuche überzeugten wir uns, daß diese Färbungen und Fluoreszenzen nicht etwa auf abgeschiedenen Aminosäuren beruhen.

Papierchromatographische Trennung der fluoreszierenden Substanzen.

Geprüft wurden die alkoholischen Extrakte der Nährlösungen von den vier *Azotobacter chroococcum*-Stämmen, *Azot. vinelandii* (BLK 1), *Azot. agile*, einem *Azot. indicum*-Stamm (St. Beijerinckia III 1216) und einem *Azot. leijerinckii*-Stamm (St. Triticum).

Als Kohlenstoffquellen dienten wieder Mannit, Na-Azetat, Na-Propionat, Na-Succinat sowie Na-Benzoat. Die Kulturdauer betrug 6 Tage, lediglich bei Stamm ATCC 4412 auf Mannit 20 bzw. 45 Std. sowie bei den Stämmen Beijerinckia III 1216 und Triticum 20 Tage. n-Propanol-Wasser (70—30), aufsteigend, ergab die besten Trennungen (vgl. Tab. 9).

Von den *Azot. chroococcum*-Stämmen zeigte St. ATCC 4412 bei Zugabe von Mannit als Kohlenstoffquelle schon nach kurzer Wachstumszeit (20 bzw. 45 Std.) eine zwar schwache, jedoch eindeutig nachweisbare blaue Fluoreszenz. Die papierchromatographische Trennung ergab vier deutlich vonein-

¹⁾ Naturwissenschaften 39, 86 (1952).

Tabelle 8.

Stamm	C-Quelle	Wuchs	pH	Farbe der Nährlösung im Tageslicht	Farbe der Nährlösung im UV-Licht
ATCC 4412	Mannit				
	20 St.	noch	6—7	fast farblos	etwas milchig blau
	45 St.	mäßig			
	Azetat	gut	9	gelb	milchig blau
Epilobium	Propionat	gut	9	gelb	milchig lavendelblau
	Succinat	gut	9	gelb	milchig blau
Viola	Mannit	sehr gut	6	gelb	milchig blau, Stich ins grünliche
	Azetat	mittel	9	schwach gelb	milchig blau
	Propionat	gut	9	hellgelb	milchig blau
	Succinat	gut	9	hellgelb	milchig blau
Mirabilis	Mannit	sehr gut	7	altrosa	milchig blau, Stich ins lindgrüne
	Azetat	mittel	9	schwach gelb	milchig blau
	Propionat	gut	9	hellgelb	milchig lavendelblau
	Succinat	schlecht	9	hellgelb	milchig blau
	Benzoat	mittel	8	goldgelb	milchig blau
BLK 1	Mannit	sehr gut	6,5	schwach gelb, St. i. grünl.	milchig gelbgrün, Stich ins hellblaue
	Azetat	schlecht	9	fast farblos	milchig blau
	Propionat	gut	9	schwach gelb	milchig blau
	Succinat	schlecht	8—9	fast farblos	milchig schw. blau
	Benzoat	gut	8—9	goldgelb	milchig blau
<i>Azot. agile</i>	Mannit	sehr gut	6	gelb, ins grünliche gehend	stark milchig gelbgrün
	Azetat	mittel	9	schwach gelb	milchig blau
	Propionat	gut	9	hellgelb	milchig blau
	Succinat	gut	9	hellgelb	milchig blau
	Benzoat	mittel	9	schwach gelb	milchig blau
Beij. 1216	Mannit	sehr gut	8	goldgelb	milchig blau
Triticum	Mannit	sehr gut	6—7	hellgelb	milchig lavendelblau
	Azetat	mittel	6—7	farblos	schwach blau
			8—9	farblos	schwach blau

ander geschiedene blau fluoreszierende Flecke. Eine aktive Abscheidung durch Bakterien ist also auch in diesem Falle anzunehmen (vgl. Abscheidung freier Aminosäuren). Auf Na-Azetat, Na-Propionat und Na-Succinat als C-Quellen war die Anzahl der Flecke verschieden. Bemerkenswert erscheint die Tatsache, daß hier stets ein grün fluoreszierender Fleck von relativ geringem Rf-Wert (0,13) auftrat.

Tab. 9. Anzahl der von den einzelnen Azotobakterstämmen in die Nährlösung abgegebenen fluoreszierenden Substanzen.

Stamm	C-Quelle				
	Mannit	Azetat	Propionat	Succinat	Benzoat
ATCC 4412	4 (20 St.)	5	7	6 (7) ¹⁾	—
	4 (45 St.)				
Epilobium	11 (12)	4	5 (6)	6 (7)	—
Viola	10 (11)	4 (5)	7 (9)	5	8 (9)
Mirabilis	5 (6)	4	5	3	7
<i>Azot. vinel.</i>	7 (8)	4 (5)	4	3	6 (7)
<i>Azot. agile</i>	7	4 (5)	3 (4)	4 (5)	5 (6)
Beijerinckia III 1216	7 (8)	—	—	—	—
Triticum	6	4	—	—	—

¹⁾ () = bedeutet einen zusätzlichen Fleck, der nicht sicher nachgewiesen werden konnte.

Stamm Epilobium und Stamm Viola zeigten bei Mannit als C-Quelle gegenüber den anderen C-Quellen die höchste Zahl fluoreszierender Flecke. Die meisten leuchteten im UV-Licht blau bis violett. Sie sind vielleicht Benzol oder Chininderivate oder weiteren komplizierten heterozyclischen Verbindungen zuzuordnen (TH. FÖRSTER, 1951). Dasselbe Bild ergaben die Chromatogramme von sämtlichen anderen, auf den verschiedenen Kohlenstoffquellen gezogenen Stämmen.

Bei Stamm Viola auf Benzoat und Propionat war wieder die grün fluoreszierende Substanz im alkoholischen Extrakt zu finden, ebenso bei Epilobium auf Mannit. Diese ließ sich ferner bei Stamm Mirabilis auf Azetat und Propionat, bei Stamm Beijerinckia III 1216 und Stamm Triticum auf Mannit sowie in Spuren bei *Azot. agile* auf Succinat, Azetat, Benzoat und Propionat nachweisen.

Sämtliche fluoreszierende Flecke wurden unter der UV-Lampe mit Bleistift umrandet. Um Aminosäuren sichtbar zu machen, besprühten wir die Chromatogramme anschließend mit Ninhydrin. Aus der Lage beider Arten von Flecken zueinander konnte nochmals bestätigt werden, daß die Fluoreszenz nicht durch abgeschiedene Aminosäuren hervorgerufen wurde, sondern durch andere Substanzen, die im Stoffwechsel gebildet, in die Nährlösung ausgeschieden worden waren.

Abscheidung von Riboflavin.

Schon im Tageslicht wurde bei den gelbgrün gefärbten Nährlösungen der Azotobakterstämm BLK I und *Azot. agile* bei Zugabe von Mannit als C-Quelle eine leichte Fluoreszenz beobachtet, die unter der UV-Lampe stark leuchtend gelbgrün hervortrat. Ein ähnliches Ergebnis im UV-Licht konnte bei Stamm Mirabilis (Mannit als C-Quelle) festgestellt werden.

Ebenso tendierte die milchig blaue Fluoreszenz der Nährlösungen von den Stämmen *Epilobium* und *Viola* (beide Mannit als C-Quelle) ins grüne. Beobachtungen dieser Art ließen bei den erwähnten Stämmen die Abscheidung eines gelbgrünen Farbstoffes annehmen. Das bestätigte auch die papierchromatographische Trennung.

Schon im Vorversuch konnte der gelbgrüne Farbstoff in der Nährlösung durch Zugabe von Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) als eine schnell reduzierbare Verbindung angesprochen werden. Sie verlor zunächst ihre Fluoreszenz und gewann durch Schütteln unter Aufnahme von Sauerstoff ihre ursprünglichen Eigenschaften wieder. Wurde derselbe Versuch an den blau fluoreszierenden Filtraten vorgenommen, so trat keine wesentliche Veränderung ein, auch dann nicht, wenn die Kulturlösung vorher vorsichtig mit verdünnter HCl neutralisiert worden war.

Die Vermutung, daß es sich bei dem gelbgrünen Farbstoff um einen Alloxazinkörper handelte, lag nahe und wir ließen daher auf dem jeweils zu prüfenden Chromatogramm eine Lösung von Riboflavin (Merck) mitlaufen. Die Chromatographie erfolgte in einer dunklen Kammer, um einen Abbau der Substanz durch Tageslicht zu vermeiden.

Die anschließende Untersuchung der Chromatogramme im Ultraviolett-Licht erbrachte bemerkenswerte Ergebnisse:

Bei *Azot. vinelandii* (St. BLK 1), *Azot. agile* sowie *Azot. chroococcum* (St. Mirabilis) stimmte sowohl der Rf-Wert als auch die Farbtönung genau mit der Testsubstanz Riboflavin überein, wie es die Abb. 8 von Stamm BLK 1 (auf Mannit) zeigt.

Während die Verbindung bei *Azot. vinelandii* (St. BLK 1) und *Azot. agile* in ziemlich hoher Konzentration vorlag (vgl. Abb. 8), war sie bei *Azot. chroococcum* (St. Mirabilis) nur in Spuren, jedoch eindeutig auf den Chromatogrammen zu erkennen.

Bei den Azotobakterstämmen *Epilobium* und *Viola* hingegen stimmte der Rf-Wert nicht mit dem des mitgelaufenen Riboflavins überein. Eine Identität war deshalb ausgeschlossen.

Der Nachweis von Riboflavin war bisher nur auf chromatographischem Wege geführt worden. Eine Bestätigung dieses Ergebnisses sollte nun noch die spektralphotometrische Messung erbringen: Eingeengte Extrakte aus den ausgeschnittenen Flecken des Chromatogramms (Probe sowie Testsubstanz) in aq. dest. ergaben mit dem Beckman-Spektralphotometer zwischen $\lambda = 350$ bis $450\text{ m}\mu$ parallelen Verlauf der Absorptionskurven.

Die Annahme von JOHNSTONE (1955), daß das von einigen Azotobakterstämmen gebildete gelbgrün floreszierende Pigment nicht Riboflavin sei, konnte somit nicht bestätigt werden.

Die Abscheidung von Riboflavin erfolgte schon nach ziemlich kurzer Zeit, wie Versuche mit *Azot. agile* und Mannit als Kohlenstoffquelle ergaben. Bereits nach 18 stünd. Wachstum war unter der UV-Lampe deutlich eine gelbgrüne Fluoreszenz zu erkennen.

Nach den bisher beschriebenen Versuchen konnte Riboflavin in den Nährlösungen bestimmter Azotobakterstämmen bei Zugabe von Mannit als Kohlenstoffquelle gefunden werden.

Dagegen war es unter Vorlage der vier weiteren Kohlenstoffquellen nicht nachzuweisen, da in deren stark alkalisch gewordenen Filtraten Riboflavin zu Lumiflavin abgebaut wurde. Lumiflavin hat einen höheren Rf-Wert und blaue Fluoreszenz.

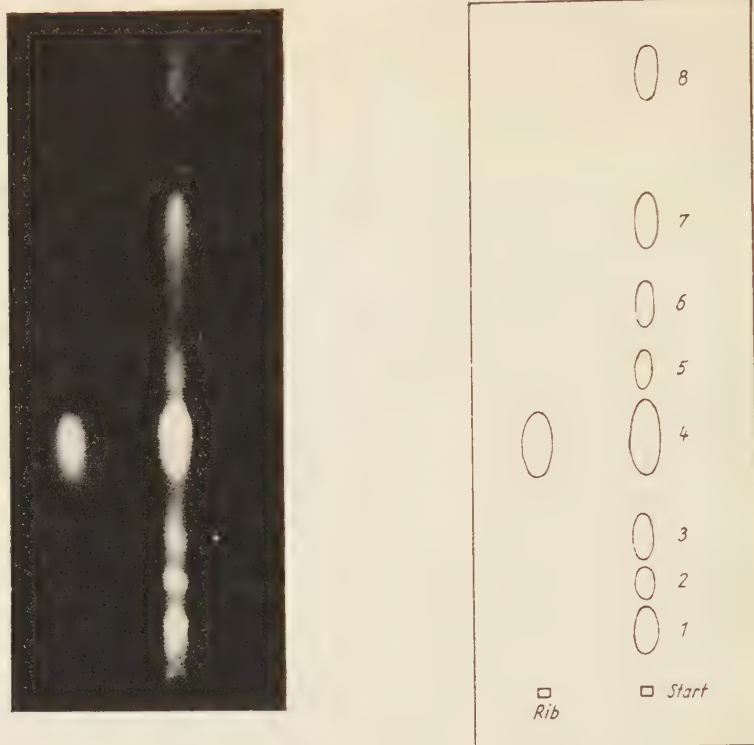


Abb. 8. Nachweis von Riboflavin im UV-Licht bei Stamm BLK 1 auf Mannit. RIB = Riboflavin (= Testsubstanz), 1 = hellblau, 2 = violett, 3 = blau, 4 = gelbgrün, 5 = blau, 6 = schwach hellblau, 7 = hellblau, 8 = violett.

Die Tatsache, daß bestimmte Azotobakterstämme die Fähigkeit haben, relativ große Mengen von Riboflavin zu bilden und in freier Form in die Nährlösung abzuscheiden, gibt Anlaß nach der Biosynthese und Bedeutung dieses Stoffes zu fragen.

Sowohl Purine als auch die Aminosäuren Serin und Threonin sind nach Arbeiten MAC LARENS¹⁾ (1952) und anderer Autoren¹⁾ bei verschiedenen Mikroorganismen als direkte Vorstufen des Riboflavins in Betracht zu ziehen.

Die Biosynthese wird jedoch bei den einzelnen Mikroorganismen spezifische Wege beschreiten, die weitgehend noch der Aufklärung bedürfen.

Auch die Frage, warum der von uns verwendete *Azot. agile* und *Azot. vinelandii*-Stamm solch beachtliche Mengen eines Vitamins bilden, obwohl beide zum normalen Funktionieren ihres Stoffwechsels nur kleinste Mengen benötigen, ist noch nicht restlos beantwortet.

In der amerikanischen Literatur wird die übermäßige Riboflavinbildung als „Fermentation“ bezeichnet (KNÜSEL).

Als Ergebnis unserer Untersuchungen kann festgestellt werden, daß die Fluoreszenz eine charakteristische, konstante Eigenschaft der Azotobakterstämme ist und zu ihrer spezifischen Unterscheidung einen wertvollen Beitrag leistet.

¹⁾ Ref. von F. KNÜSEL (1957).

Zusammenfassung:

1. Unter Vorgabe von fünf verschiedenen Kohlenstoffquellen wurden vier *Azotobacter chroococcum*-Stämme, zwei *Azot. beijerincki*-Stämme, ein *Azot. agile*-Stamm, ein *Azot. vinelandii*-Stamm sowie zwei *Azot. indicum*-Stämme auf die Eiweißzusammensetzung ihrer Bakterienkörper und ihre Nährlösungen auf Abscheidung verschiedener Substanzen untersucht.

Als Kohlenstoffquellen fanden Verwendung: Mannit (als Vergleichsgrundlage), ferner Na-Azetat, Na-Propionat, Na-Succinat, Na-Benzoeat.

2. Hinsichtlich der Wachstumsintensität und der Farbstoffbildung zeigten sich je nach Kohlenstoffquelle Unterschiede bei den einzelnen Stämmen.
3. Die *Azot. chroococcum*-Stämme Epilobium und ATCC 4412 konnten Na-Benzoeat nicht als Kohlenstoffquelle verwenden; die beiden *Azot. indicum*-Stämme wuchsen nur auf Mannit gut, ebenso der *Azot. beijerincki*-Stamm Taraxacum, während der Stamm Triticum neben Mannit noch Acetat verwertete.

Das beste Wachstum aller Stämme erfolgte mit Mannit als C-Quelle.

4. Die papierchromatographische Prüfung der Eiweißhydrolysate der einzelnen Azotobakterstämme ergab 17 Aminosäuren und einen Aminozyucker. Durch Beigabe von verschiedenen Kohlenstoffquellen traten qualitativ bei den verwendeten Stämmen keine Unterschiede in der Proteinzusammensetzung auf. Alle untersuchten Azotobakterstämme weisen qualitativ die gleiche Eiweißzusammensetzung auf.
5. In den Mengen der einzelnen Aminosäuren (relativ zueinander) ergaben sich bei allen Stämmen Unterschiede, auch im Hinblick auf die Verwertung der verschiedenen Kohlenstoffquellen. Die niedermolekularen Kohlenstoffgerüste scheinen im allgemeinen besser zum Aufbau des art eigenen Eiweißes verwertet zu werden, als die höhermolekularen.

Im Verhältnis zu den übrigen Aminosäuren stehen bei dem *Azot. agile*-Stamm Alanin und Glutaminsäure bei den fünf verwendeten Kohlenstoffquellen an der Spitze; bei den anderen Stämmen war keine derartige Reihenfolge festzustellen.

6. Mit Ausnahme der Filtrate der beiden *Azot. indicum*-Stämme konnten in den Nährlösungen sämtlicher übriger Azotobakterstämme Aminosäuren nachgewiesen werden. Glutaminsäure, Asparaginsäure und Alanin fanden sich bei den meisten Stämmen in der Kulturlösung.

Die Aminosäureabscheidung der auf Mannit gewachsenen Stämme war sehr gering.

7. Versuche mit dem raschwüchsigen *Azot. chroococcum*-Stamm ATCC 4412 bei Zugabe von Mannit als Kohlenstoffquelle ergaben, daß eine aktive Aminosäureausscheidung der Bakterien durchaus möglich ist.

Jedoch dürfte ein Teil der in der Nährlösung vorhandenen freien Aminosäuren auch als Autolyseprodukte angesprochen werden.

8. Eine Abscheidung freier Zucker in die Nährlösung war in keinem Falle nachzuweisen.

Der von den einzelnen Azotobakterstämmen gebildete Schleim setzt sich aus Polysacchariden zusammen. Als Bausteine konnten nach der Hydrolyse Glukose, Galaktose, Mannose, Rhamnose, Glukuronsäure sowie Glukosamin nachgewiesen werden.

Rhamnose fehlte bei den *Azot. beijerincki*-Stämmen. Die vorgegebenen fünf Kohlenstoffquellen hatten keinen Einfluß auf die Zusammensetzung des Azotobakterschleimes.

9. Die zellfreien Nährlösungen sämtlicher von uns verwendeten Azotobakterstämmen fluoreszierten im UV-Licht. Es konnten verschiedene fluoreszierende Substanzen festgestellt werden. Es wurde nachgewiesen, daß der *Azot. agile*-Stamm, der *Azot. vinelandii*-Stamm (BLK 1) sowie der *Azot. chroococcum*-Stamm Mirabilis Riboflavin abscheiden.
10. Die vorliegenden Untersuchungen der Bakterienzellen und ihrer Filtrate zeigten, daß die von uns verwendeten Azotobakterstämmen zwar alle zur Gruppe „Azotobakter“ zu rechnen sind, jedoch zum Teil beachtliche Unterschiede in ihrem physiologischen Verhalten aufweisen und somit spezifisch zu unterscheiden sind:

Die Species *chroococcum* erscheint demnach aus physiologisch unterschiedlichen Typen aufgebaut; andererseits sind die Species *agile* und *vinelandii* in mancher Hinsicht einander sehr ähnlich, nicht nur im Habitus (vgl. Taf. II), sondern auch in den Nährstoffansprüchen und der Abscheidung fluoreszierender Stoffe.

Der Stamm „Mirabilis“ von *Azot. chroococcum* tendiert diesbezüglich in Richtung der Species *agile* und *vinelandii*.

Schrifttum.

- BERGEY, D. H., Manual of Determinative Bacteriology. The Williams & Wilkins Company, Baltimore 1948. — BUKATSCH, F., und HEITZER, J., Beiträge zur Kenntnis der Physiologie von Azotobakter. Arch. Mikrobiol. **17**, 79—96 (1952). — BURGER, M., Bacterial Polysaccharides. Charles C. Thomas Publ., Springfield 1950. — BURGER, K., und BUKATSCH, F., Über die Wuchsstoffsynthese frei lebender, stickstoffbindender Bakterien. Zbl. Bakter. II **111**, 1—28 (1958). — BURRIS, R. H., Distribution of Isotopic Nitrogen in *Azotobacter vinelandii*. Journ. of Biol. Chem. **143**, 509—517 (1942). — CAMIEN, M. N., SALLE, J., and DUNN, M., Investigations of Amino Acids, Peptides and Proteins. XXII Percentages of some Amino Acids in *Lactobacilli*. Arch. Biochem. **8**, 67—78 (1945). — COOPER, R. A., Enzyme Formation and Polysaccharide Synthesis by Bacteria. III Polysaccharides produced by nitrogen fixing organisms. Biochem. Journ. **32**, 1752—1758 (1938). — CRAMER, F., Papierchromatographie, 4. Aufl. Weinheim/Bergstr. 1958. — DUDMANN, W. F., and WILKINSON, J. F., The Composition of the extracellular Polysaccharides of Aerobakter — *Klebsiella* Strains. Biochem. J. **62**, 289—295 (1956). — DUGUID, J. P., The influence of cultural Conditions on the Morphology of *Bacterium aerogenes* with Reference to Nuclear Bodies and Capsule. J. of Path. **60**, 265—274 (1948). — EBERT, B. P., und RUBEL, N. N., Zur Serologie von Azotobakter. Zbl. Bakter. II **90**, 272 (1934). — FIESER, L. F., und FIESER, M., Lehrbuch der organischen Chemie. Verlag Chemie G. m. b. H., Weinheim/Bergstr. 1954. — FISCHER, W. K., Untersuchungen zur Stammfrage bei *Azotobacter chroococcum*. Arch. Mikrob. **14**, 352—406 (1950). — FÖRSTER, TH., Fluoreszenz organischer Verbindungen. Göttingen 1951. — GAINNEY, P. L., Sources of Energy for Azotobakter, with Spezial Reference for Fatty Acids. Ann. Missouri Bot. Garden **15**, 113—168 (1928). — GREENE, R. A., Studies on Protein Synthesis by the genus *Azotobacter*. Soil. Sc. **39**, 327—336 (1935). — HOUCH, L. J., JONES, J. K., and WADMAN, W. H., Quantitative Analysis of Mixtures of Sugars by the Method of Partition Chromatography. Part V Improved Methods for

the Separation and Detection of the Sugars and their Methylated Derivatives on the Paper Chromatogram. J. of chem. Soc. London, 1702 (1950). — JENSEN, H. L., The Azotobacteriaceae. Bact. Rev. **18**, 195 (1954). — JOHNSTONE, D. B., Azotobacter fluorescence. J. Bact. **69**, 481—482 (1955). — KANDLER, O., und ZEHENDER, C., Papierchromatographische Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung verschiedener Bakterienhydrolysate. Arch. Mikrobiol. **24**, 41—48 (1956). — KNÜSEL, F., Die Biosynthese des Riboflavins bei *Candida Guilliermondii* (A. east) Langeron und Guerra und einigen verwandten Arten. Arch. Mikrobiol. **27**, 219—259 (1957). — LAWSON, G. J., and STACEY, M., Immunopolysaccharides. Part I Preliminary studies of a Polysaccharide from *Azotobacter chroococcum*, containing a Uronic Acid. J. chem. Soc. London **2**, 1925—1931 (1954). — LINSKENS, H. F., Papierchromatographie in der Botanik. Springer Verlag, Göttingen 1955. — MOLER, TH., Ein Beitrag zur Kenntnis der Entbindung des durch *Azotobakter* fixierten Stickstoff. Zbl. Bakter. II **47**, 635 (1917). — OMELIANSKY, W. L., und SIEBER, N. O., Zur Frage nach der chemischen Zusammensetzung des *Azotobacter chroococcum*. Zschr. physiol. Chemie **88**, 445—459 (1913). — PAECH, K., und TRACEY, M. O., Moderne Methoden der Pflanzenanalyse II. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955. — POSCHENRIEDER, H., *Azotobakter* als Boden- und Wurzelbakterium. Diss. Weihenstephan 1926. — RADLER, F., Untersuchungen über den Verlauf der Stoffwechselvorgänge bei *Azotobacter chroococcum*. Arch. Mikrob. **22**, 335—367 (1955). — DE REGEL, S., Entwicklungsvorgang von *Azotobacter chroococcum*. Zbl. Bakter. II **86**, 44—68 (1932). — RIPPEL, A., Eisen-, Agar- und Humuswirkung bei *Azotobakter*. Arch. Mikrobiol. **7**, 590—597 (1936). — RUHLAND, W., Handbuch der Pflanzenphysiologie VI, VIII. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958. — STAPP, C., Über die Reserveinhaltsstoffe und den Schleim von *Azotobacter chroococcum*. Zbl. Bakter. II **61**, 276—292 (1924). — STAPP, C., und RUSCHMANN, Zur Biologie von *Azotobakter*. Arb. biol. Reichsanst. Land- u. Forstw. **13**, 305—368 (1924). — STOKES, J. L., and GUNNES, M., The Amino Acid Composition of Microorganisms. J. Bact. **52**, 195—207 (1946). — TOMCSIK, J., and HOLZER, G., Demonstration of the Bacterial Capsule by means of a pH dependent, salt like Combination with Proteins. J. gen. Microb. **10**, 97—109 (1954). — UNGERER, E., Über die Entstehung des Pigmentes von *Azotobacter chroococcum*. Zschr. Pflanzenernähr., Düng. u. Bodenkde. Abt. A **36**, 287—290 (1934). — VIRTANEN, A. J., and LAINE, T., The Decarboxylation of d-Lysine and l-Aspartic Acid. Enzymologia (Haag) **3**, 266—270 (1937). — VIRTANEN, A. J., v. HAUSEN, and LAINE, T., Investigations on the root nodule. XIX Influence of various factors on the excretion of nitrogenous compounds from the nodules. J. agric. Sci. **27**, 332—348 (1937). — WERKMAN, C. H., and WILSON, P. W., Bacterial Physiology. Academic Press, New York 1951. — WILKINSON, J. F., DUGUID, J. P., and EDMUNDS, P. N., The Distribution of Polysaccharide Production in *Aerobacter* and *Escherichia* Strains and its Relation to Antigenic Character. J. gen. Microb. **11**, 59—72 (1954).

Anschriften der Verfasser:

Dr. rer. nat. Maria Schlüter, Freising, Münchener Str. 42.

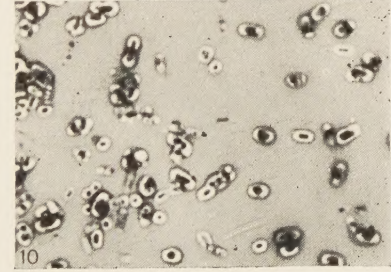
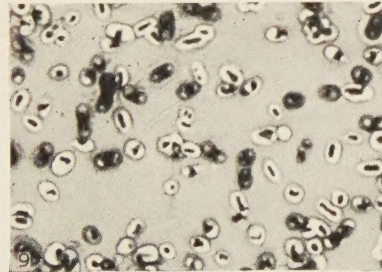
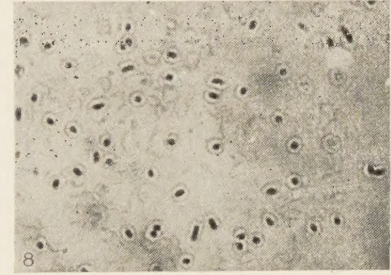
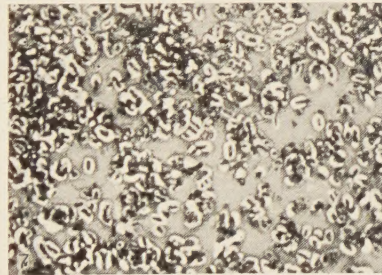
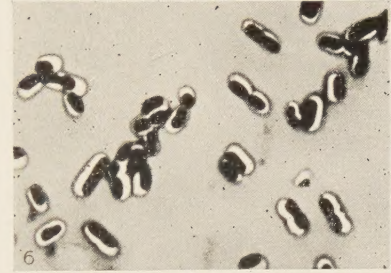
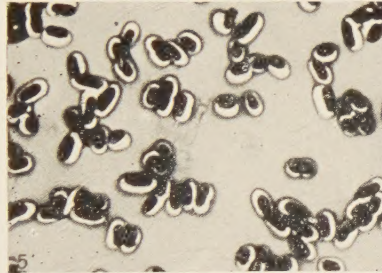
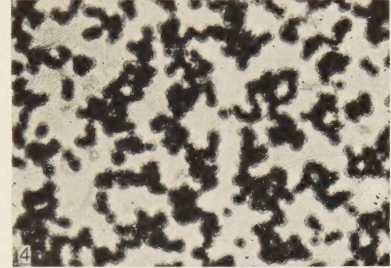
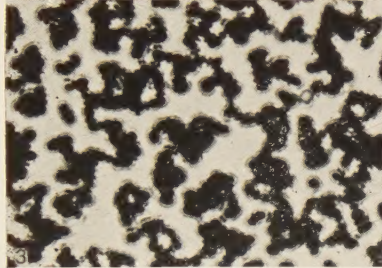
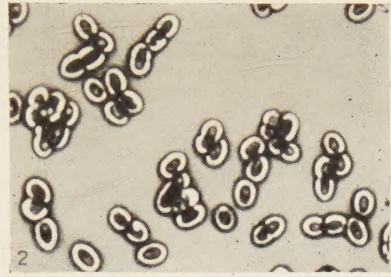
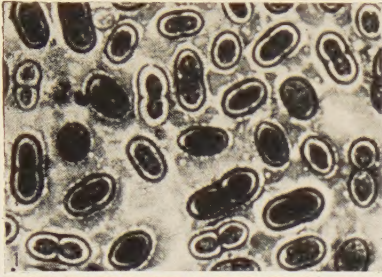
Prof. Dr. Franz Bukatsch, München 42, Salzburger Str. 4.

Tafelerklärung.

Tafel II.

Azotobakter-Stämme, bei gleicher Vergrößerung (1700 fach) nach Karbolfuchsin-(ZIEHL-NEELSEN-) Färbung mit Leitz-Panphot (phot. E. KRAUSE).

- | | |
|--|--|
| 1 <i>Azot. chroococcum</i> St. Mirabilis | 6 <i>Azot. agile</i> |
| 2 <i>Azot. chroococcum</i> St. ATCC 4412 | 7 <i>Azot. beijerinckii</i> St. Triticum |
| 3 <i>Azot. chroococcum</i> St. Epilobium | 8 <i>Azot. beijerinckii</i> St. Taraxacum |
| 4 <i>Azot. chroococcum</i> St. Viola | 9 <i>Azot. indicum</i> St. Beijerinckia III
1216 |
| 5 <i>Azot. vinelandii</i> St. BLK 1 | 10 <i>Azot. indicum</i> St. Beijerinckia III
1217 |



Schlüter u. Bukatsch

VEB GUSTAV FISCHER VERLAG JENA

Lebenslauf

Ich, Maria Susanne Schlüter, wurde am 27. Februar 1928 als 4. Kind der Eheleute Anton und Maria Schlüter in Freising geboren.

Nach 4 Jahren Volksschule trat ich 1938 in die Städt. Mädchenoberrealschule Freising über. Von 1942—43 besuchte ich die Oberschule Kolmar-Berg, von 1943—44 die Oberschule Achern. Seit 1946 war ich wieder an der Städt. Mädchenoberrealschule Freising und legte dort 1948 die Reifeprüfung ab.

Im Jahre 1949 immatrikulierte ich mich bei der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München. Während meines Studiums war ich im Rahmen des Studentenaustausches ein Jahr (1952—53) in den Vereinigten Staaten von Nordamerika. Im Herbst 1955 legte ich an der Universität München in Biologie, Chemie und Geographie die Wissenschaftliche Prüfung für das Höhere Lehramt ab.

Unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Franz Bukatsch habe ich am Botanischen Institut der Universität München vorliegende Arbeit angefertigt.

